

PCT/JP03/16682

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

25.12.03

JP03/16682

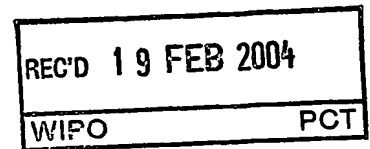
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年12月26日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-377819  
[ST. 10/C]: [JP2002-377819]

出 願 人  
Applicant(s): 梶原 康宏  
大塚化学株式会社

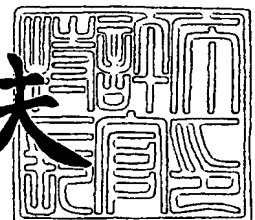


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 S20226

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 2/00

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区牛久保東 2 - 4 - 2 - 2 0 5

    【氏名】 梶原 康宏

【特許出願人】

    【識別番号】 502244258

    【氏名又は名称】 梶原 康宏

【特許出願人】

    【識別番号】 302060306

    【氏名又は名称】 大塚化学株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100081536

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 田村 巖

    【電話番号】 06-6864-3137

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 020086

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

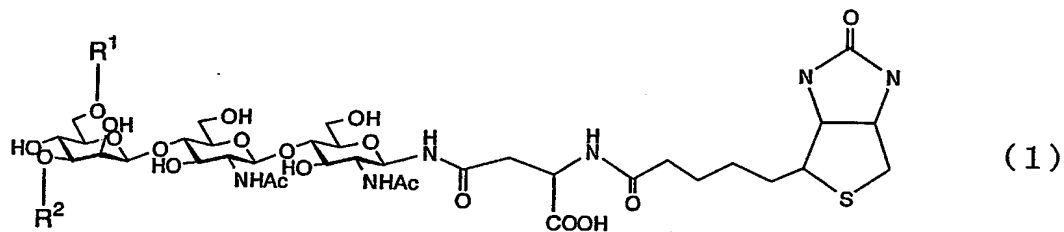
【書類名】 明細書

【発明の名称】 ビオチン化  $\alpha$  2, 6 糖鎖アスパラギンおよびその製造方法

【特許請求の範囲】

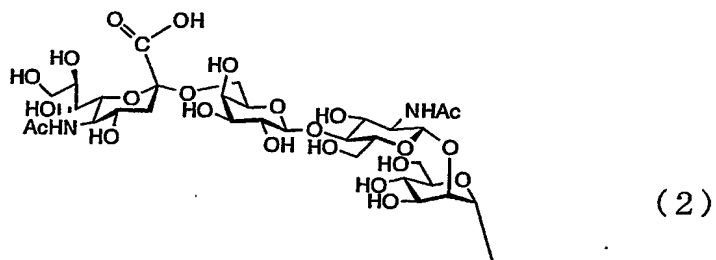
【請求項 1】 下記式で表されるビオチン化糖鎖アスパラギン。

【化 1】

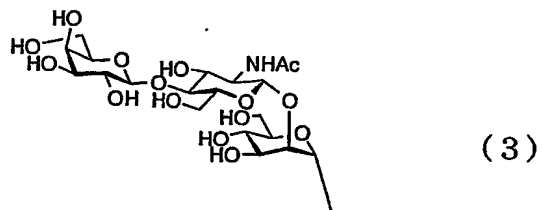


〔式中、 $R^1$  および  $R^2$  は、H、又は式 (1) ~ (5) で示される基であり、同一でも異なってもよい。〕

【化 2】



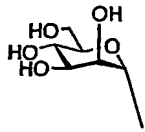
【化 3】



【化 4】



## 【化 5】



(5)

【請求項 2】 非還元末端にシアル酸を有する請求項 1 記載のビオチン化糖鎖アスパラギン。

【請求項 3】 糖鎖アスパラギンのアスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化することを特徴とする請求項 1 のビオチン化糖鎖アスパラギンの製造方法。

【請求項 4】 糖鎖アスパラギンのアスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化することを特徴とする請求項 2 の非還元末端にシアル酸を有するビオチン化糖鎖アスパラギンの製造方法。

【請求項 5】 請求項 1 又は 2 のビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたマイクロプレート。

【請求項 6】 請求項 1 又は 2 のビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたアフィニティーカラム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明はビオチン化  $\alpha$  2, 6 糖鎖アスパラギン、その製造方法及びその用途に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

近年、核酸（DNA）、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されてきている。ヒトの体は、約 60 兆個の細胞から成っている一大細胞社会であり、全ての細胞表面は糖鎖分子によって覆われている。例えば、ABO 式血液型は細胞表面の糖鎖の違いにより決定されている。

糖鎖は、細胞間の認識や相互作用に関わる働きをもち、細胞社会を成り立たせる要となっている。細胞社会の乱れは、癌、慢性疾患、感染症、老化などにつながる。

## 【0003】

例えば、細胞が癌化すると糖鎖の構造変化が起こることが分かっている。また、コレラ菌やインフルエンザウイルスなどは、ある特定の糖鎖を認識し結合することにより、細胞に侵入し感染することが知られている。

糖鎖は単糖の配列、結合様式・部位、鎖の長さ・分岐様式、全体の高次構造などの多様性から、核酸やタンパク質の構造と比べると非常に複雑な構造である。従って、その構造に由来する生物学的な情報は核酸やタンパク質に比べて多種多様である。糖鎖は、研究の重要性を認識されながらも、その構造の複雑さや多様性により、核酸やタンパク質に比べて研究の推進が遅れている状況にある。

## 【0004】

上述のようにある特定の糖鎖とタンパク質とが認識し結合能を有しているかを解明することにより、新しい原理に基づく医薬品や食品の開発などをもたらし、病気の予防、治療に貢献するなど、幅広い応用が期待されている。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

そこで、ビオチン・アビジンの結合特異性を利用し、ビオチン化した複数の糖鎖をアビジン化されたマイクロプレート上で反応させるだけで簡単に糖鎖マイクロチップを製造することができる。これにより、特定の糖鎖と結合能を有するタンパク質を解明することができる。

## 【0006】

また、ある特定のタンパク質を分離精製する目的で、アビジン化したアフィニティーカラムに特定のビオチン化した糖鎖を結合し固定化し、そこに、ビオチン化した糖鎖と特異的結合能を有するタンパク質を含む混合物を通すことにより目的とするタンパク質のみを単離することができる。

## 【0007】

本発明の課題は、アスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化した糖鎖アスパラギン、その製造方法及びその用途を提供することにある。

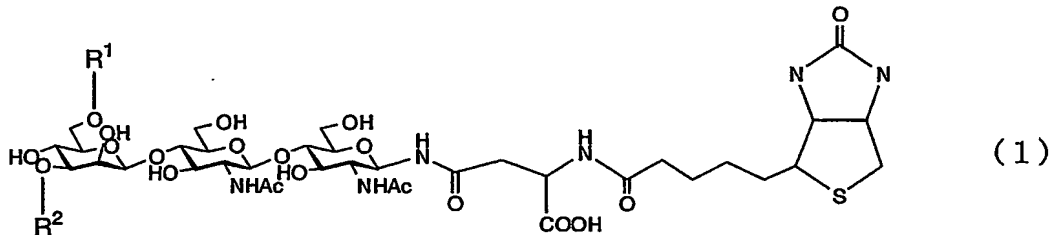
## 【0008】

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、下記式で表されるビオチン化糖鎖アスパラギンに係る。

【0009】

【化6】



〔式中、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は上記に同じ。〕

【0010】

本発明は、非還元末端にシアル酸を有するビオチン化糖鎖アスパラギンに係る。

。

【0011】

本発明は、糖鎖アスパラギンのアスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化することを特徴とするビオチン化糖鎖アスパラギンの製造方法に係る。

【0012】

本発明は、糖鎖アスパラギンのアスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化することを特徴とする非還元末端にシアル酸を有するビオチン化糖鎖アスパラギンの製造方法に係る。

【0013】

本発明は、ビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたマイクロプレートに係る。

。

本発明は、ビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたアフィニティーカラムに係る。

【0014】

本発明者は、先に特願 2001-185685 号（以下、先願という）において、種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖の製造方法、更には糖残基が任意に欠失した糖鎖が結合した新規な糖鎖アスパラギン

誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖を開発した。

【0015】

この先願の方法は例えば

(1) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

ならびに

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、

を含む、糖鎖アスパラギン由来の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(2) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程をさらに含む前記 (1) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(3) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式 (A) の化合物および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (1) または (2) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(4) 脂溶性の保護基がフルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基である前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(5) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

【0016】

(6) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、ならびに

(c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、

を含む、糖鎖アスパラギンの製造方法、

(7) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および/または

(c') 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、

をさらに含む、前記 (6) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(8) 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式 (A) の化合物および/または該化合物において 1 以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (6) または (7) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

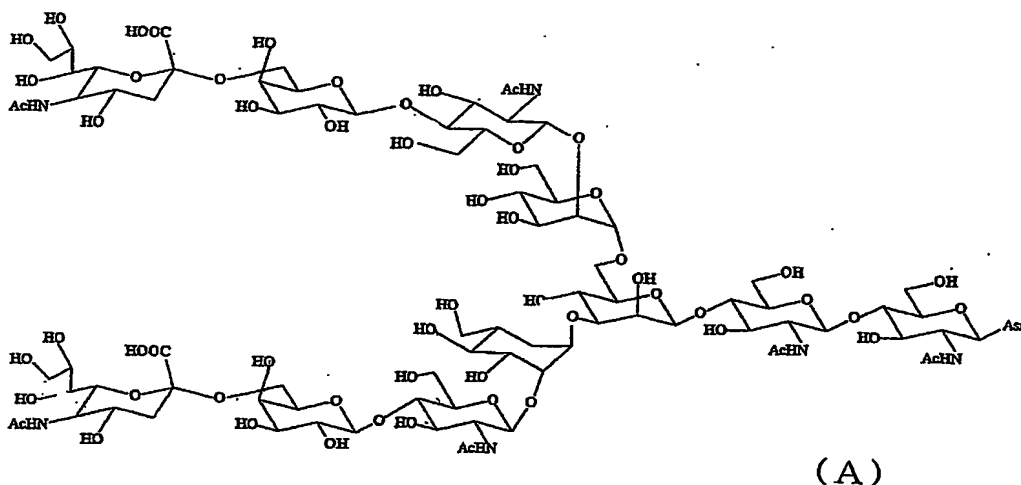
(9) 脂溶性の保護基が Fmoc 基である前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(10) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに Fmoc 基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法などである。

【0017】



## 【化7】



(A)

## 【0018】

これら糖鎖アスパラギン誘導体及び糖鎖アスパラギンの製造についての詳細は、上記先願に述べられているので、これを引用する。しかし若干先願の内容について述べると、先願の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、たとえば、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖アスパラギン、好ましくはアスパラギン結合型糖鎖から得られる糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入（結合）して糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を得た後に当該混合物を各糖鎖アスパラギン誘導体に分離することを1つの大きな特徴とする。なお、本明細書において、「糖鎖アスパラギン」とはアスパラギンが結合した状態の糖鎖をいう。また、「アスパラギン結合型糖鎖」とはタンパク質のポリペプチド中のアスパラギン（Asn）の酸アミノ基に、還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンがN-グリコシド結合した糖鎖群であって、Man ( $\beta 1-4$ ), GlcNac ( $\beta 1-4$ ) GlcNacを母核とする糖鎖群をいう。「糖鎖アスパラギン誘導体」とはアスパラギン残基に脂溶性の保護基が結合した状態の糖鎖アスパラギンをいう。また、化合物の構造式中、「AcHN」はアセトアミド基を示す。

## 【0019】

前記するように、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖は非還元末端の糖残基がランダムに欠失した糖鎖の混合物である。本発明者らは、意外にも天然の糖タン

パク質に由来する糖鎖、具体的には糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入することで、当該保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を公知のクロマトグラフィーの手法を用いて容易に個々の糖鎖アスパラギン誘導体に分離することができることを見出した。それにより、種々の構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ大量に調製することが可能となった。たとえば、従来分離が困難であった類似構造の糖鎖アスパラギン誘導体同士の分離が可能となり、それらの化合物を各々、容易かつ大量に調製することができる。また、得られた糖鎖アスパラギン誘導体を元に、たとえば、糖加水分解酵素を順次作用させて糖残基を除去することにより、さらに様々な糖鎖アスパラギン誘導体を合成することもできる。

#### 【0020】

このように、糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して誘導体化することにより個々の糖鎖アスパラギン誘導体の分離が可能となったが、これは、脂溶性の保護基を導入したことにより糖鎖アスパラギン誘導体の全体の脂溶性が高まり、たとえば、好適に使用される逆相系カラムとの相互作用が格段に向上し、その結果、より鋭敏に糖鎖構造の差を反映して個々の糖鎖アスパラギン誘導体が分離されるようになったことによると考えられる。

さらに、先願によれば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することにより種々の糖鎖アスパラギンを、人工的に容易かつ大量に得ることができる。

本発明では、上記先願で得られた各種の糖鎖アスパラギンを用いて、本発明の上記方法により、目的とする糖鎖アスパラギン誘導体を得るものである。

#### 【0021】

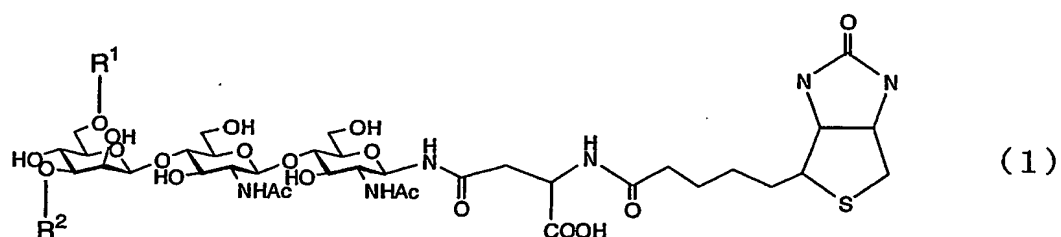
##### 【発明の実施の形態】

本発明は、糖鎖アスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化した糖鎖アスパラギンである。

本発明のビオチン化 $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギンとしては、例えば、下記式で表される化合物を挙げることができる。

#### 【0022】

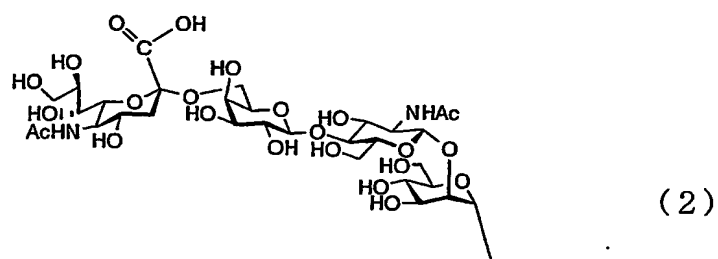
## 【化 8】



〔式中、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、H、又は式 (1) ~ (5) で示される基であり、同一でも異なってもよい。〕

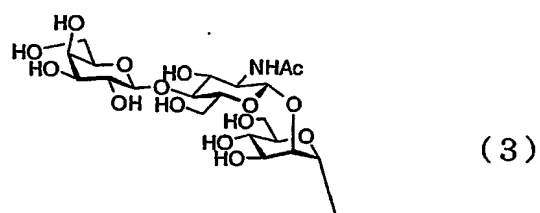
【0023】

## 【化 9】



【0024】

## 【化 10】



【0025】

## 【化 11】



【0026】

## 【化12】



## 【0027】

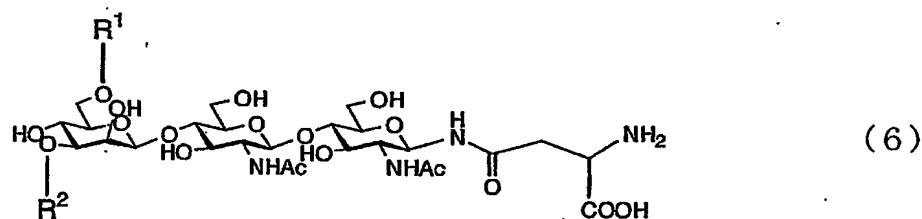
また、本発明は、糖鎖アスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化したビオチン化糖鎖アスパラギンの製造方法である。

本発明のビオチン化糖鎖アスパラギンの製造方法としては、例えば、上記に示した種々の単離された糖鎖アスパラギンのアスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化することにより得ることができる。

本発明で使用される糖鎖アスパラギンとしては、例えば、式(6)で表される化合物を挙げることができる。

## 【0028】

## 【化13】



(式中、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は上記に同じ。)

## 【0029】

具体的な糖鎖アスパラギンとしては、先願に記載された化合物を挙げることができる。即ち、先願の第3～4図に示された化合物を同様に用いることができ、これら化合物を本発明の図1～3に示す。

また上記糖鎖アスパラギンを合成するために用いられた糖鎖アスパラギン誘導体としても、先願に記載された化合物を挙げることができる。即ち、先願の第1～2図に示された化合物を同様に用いることができ、これら化合物を本発明の図4～6に示す。

## 【0030】

本発明のビオチン化としては、公知の方法に従って行うことができる。例えば

、糖鎖アスパラギンを水に溶かし重炭酸ナトリウムを加え、ここに、D- (+)-ビオチニルスクシンイミドを溶かしたジメチルホルムアミドを加え、室温で20分反応させ、ゲルろ過カラム等で精製し、ビオチン化糖鎖アスパラギンを得ることができる。

本発明のビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたマイクロプレートは、市販のアビジン化したマイクロプレート（例えば、ピアス社製）に、ビオチン化した糖鎖アスパラギンを反応させることにより製造することができる。

また、本発明のビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたアフィニティーカラムは、市販のアビジン化したアフィニティーカラムに、ビオチン化した糖鎖アスパラギンを反応させることにより製造することができる。

### 【0031】

かかる糖鎖類は医薬品開発等の分野において非常に有用である。たとえば、医薬品開発における応用例としては、たとえば、ガンのワクチン合成があげられる。細胞がガン化すると体内にはなかった糖鎖が発現することが知られている。また、当該糖鎖を化学的に合成し、ワクチンとして個体に投与すると、ガンの増殖が抑制されることも知られている。そこで、本発明により所望の糖鎖類を製造することができれば、ガンの治療に有効なワクチンの合成を行うことが可能である。また、本発明により得られる糖鎖類を、さらに化学的な反応および糖転移酵素による反応などを組み合わせて新たな糖残基を結合させて誘導体化し、新規なワクチンの合成を行うことも可能である。

### 【0032】

#### 【実施例】

以下に実施例を挙げて説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるものではない。なお、 $^1\text{H-NMR}$ のデータは、実施例1～7については $30^\circ\text{C}$ でHODを $4.8\text{ ppm}$ として、実施例8～45については $30^\circ\text{C}$ で内部標準としてアセトンのメチル基のシグナルを $2.225\text{ ppm}$ 、HODを $4.718\text{ ppm}$ として測定して得られた値である。また、Fmoc基が除去された化合物については測定溶媒中に $50\text{ mM}$ の炭酸水素アンモニウムを共存させて測定した。

### 【0033】

## 参考例 1 ジシアロ糖鎖アスパラギン (化合物 24) の合成

卵由来粗精製SGP (シアリルグリコペプチド) 2.6 gをトリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液 (TRIZMA BASE 0.05 mol/l、塩化カルシウム 0.01 mol/l、pH 7.5) 100 mlに溶解させた。これにアジ化ナトリウム 58 mg (772  $\mu$ mol) とアクチナーゼ E (科研製薬社製) 526 mgを加え、37℃で静置した。65時間後、再びアクチナーゼ E を 263 mg 加え、更に 37℃で 24 時間静置した。この溶液を凍結乾燥した後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25、2.5  $\phi$  × 1 m、展開溶媒は水、流速は 1.0 ml/min) で 2 回精製し、化合物 24 を 1.3 g (555  $\mu$ mol) 得た。

## 【0034】

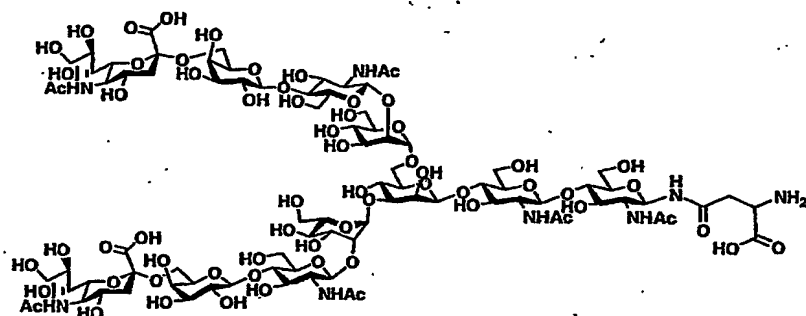
得られた化合物 24 の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30℃)

5.15 (1H, s, Man 4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc 1-H1), 4.95 (1H, s, Man 4'-H1), 4.82 (1H, s, Man 3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc 2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc 5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal 6,6'-H1), 4.34 (1H, d, Man 3-H2), 4.27 (1H, d, Man 4'-H2), 4.19 (1H, d, Man 4-H2), 3.03 (1H, dd, Asn- $\beta$ CH), 3.00 (1H, dd, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc 7,7'-H3eq), 2.15 (18H, s × 6, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc 7,7'-H3ax)

## 【0035】

## 【化14】



## 【0036】

## 参考例2 化合物1、2、6および10の合成

参考例1で得られた化合物24 (609 mg, 261  $\mu$ mol) を水20.7 ml に溶解させ、さらに0.1規定塩酸13.8 ml を加えた。この溶液を70℃で35分間加熱した後速やかに氷冷し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えpH 7とした。これを凍結乾燥した後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25、2.5  $\phi$  × 1 m、展開溶媒は水、流速は1.0 ml/min) で精製したところ、化合物24、化合物25および29、化合物33の混合物534 mgを得た。この4成分はそれぞれを単離することなく次の工程に進めた。

なお、得られた糖鎖混合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 30℃)

5.13 (s, Man4-H1), 5.12 (s, Man4-H1), 5.01 (d, GlcNAc1-H1), 4.94 (s, Man4'-H1), 4.93 (s, Man4'-H1), 4.82 (s, Man3-H1), 4.60 (d, GlcNAc2-H1), 4.58 (d, GlcNAc5,5'-H1), 4.47 (dd, Gal6,6'-H1), 4.44 (d, Gal6,6'-H1), 4.24 (d, Man3-H2), 4.19 (d, Man4'-H2), 4.11 (d, Man4-H2), 2.97 (bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.72 (dd, NeuAc7-H3eq, NeuAc7-H3eq), 2.64 (bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (s × 5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7-H3ax, NeuAc7'-H3ax)

## 【0037】

得られた糖鎖の混合物429mgをアセトン16.3mlと水11.2mlに溶解させた。ここに9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネート (155.7mg, 461.7 $\mu$ mol) と炭酸水素ナトリウム (80.4mg, 957 $\mu$ mol) を加え、室温で2時間攪拌した。この溶液をエバポレーターに供してアセトンを除き、残りの溶液をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25、2.5 $\phi$ ×1m、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min) で精製したところ、化合物1、化合物2および6、化合物10の混合物309mgが得られた。この混合物をHPLC (ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：メタノール=65:35、2.0 $\phi$ ×25cm、流速3ml/min) を用いて精製したところ、51分後に化合物1が、67分後に化合物2および6の混合物が、93分後に化合物10が溶出した。それぞれを取り分け凍結乾燥を行った後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25、2.5 $\phi$ ×30cm、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min) で脱塩することで目的の化合物2および6の混合物150mgを得た。

## 【0038】

なお、得られた化合物1の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C)

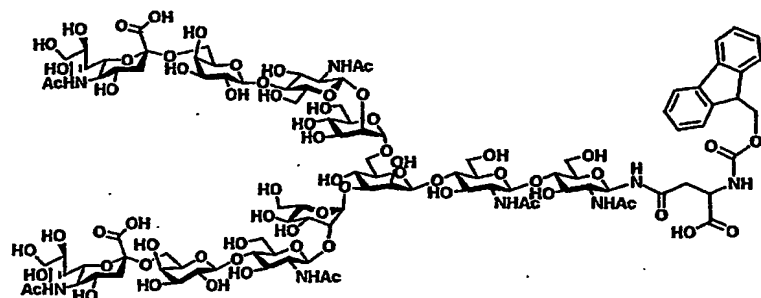
7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6,6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 3.00 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7,7'-H3eq), 2.15 (18H, s×6, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7,7'-H3ax); HRMS Calcd for  $\text{C}_{103}\text{H}_{154}\text{N}_8\text{NaO}_{66}$  [M+Na



+] 2581.8838, found, 2581.8821

【0039】

【化15】



【0040】

また、得られた化合物 2 および 6 の混合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

7.99 (d, Fmoc), 7.79 (d, Fmoc), 7.55 (m, Fmoc), 5.14 (s, Man4-H1), 5.12 (s, Man4-H), 5.00 (d, GlcNAc1-H1), 4.94 (s, Man4'-H1), 4.93 (s, Man4'-H1), 4.82 (s, Man3-H1), 4.60 (d, GlcNAc2-H1), 4.58 (d, GlcNAc5,5'-H1), 4.46 (dd, Gal6,6'-H1), 4.44 (d, Gal6,6'-H1), 4.24 (d, Man3-H2), 4.19 (d, Man4'-H2), 4.11 (d, Man4-H2), 2.97 (bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.72 (dd, NeuAc7-H3eq, NeuAc7-H3eq), 2.64 (bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (s $\times$ 5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7-H3ax, NeuAc7'-H3ax)

【0041】

また、得られた化合物 10 の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.12 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H

, d, GlcNAc1-H1), 4.93 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6,6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, bdd, Asn-βCH), 3.00 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.15 (12H, s×4, -Ac); HRMS Calcd for C<sub>81</sub>H<sub>120</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>50</sub> [M+Na+] 1999.6930, found, 1999.6939

#### 【0042】

##### 参考例3 化合物3および7の合成

参考例2で得られた化合物2および6の混合物(224mg, 97μmol)とウシ血清アルブミン24mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH6.0)22mlに溶解させ、さらに*Diplococcus pneumoniae*由来β-ガラクトシダーゼ(1.35U)を加えた。この溶液を37℃で15時間静置した後、凍結乾燥を行った。残留物をHPLC(ODSカラム、2.0φ×25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=85:15、流速3ml/min)で精製したところ、129分後に化合物3が、134分後に化合物7が溶出した。それぞれを取り分け、凍結乾燥を行った。続いてHPLC[ODSカラム、2.0φ×25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水:アセトニトリル(容量比)=10:0から85:15、31分後から45分後までは水:アセトニトリル=85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min]を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物3が81mg、化合物7が75mg得られた。

#### 【0043】

なお、得られた化合物3の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 30℃)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (

4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, S, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (1H, d, Gal6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 2.97 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H3eq), 2.61 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (15H, s $\times$ 5, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7'-H3ax); HRMS Calcd for C<sub>86</sub>H<sub>127</sub>N<sub>7</sub>NaO<sub>53</sub> [M+Na+] 2128.7356, found, 2128.7363

**【0044】**

また、得られた化合物7の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 30℃)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, S, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (1H, d, Gal6-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 2.97 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H3eq), 2.60 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (15H, s $\times$ 5, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7-H3ax); HRMS Calcd for C<sub>86</sub>H<sub>125</sub>N<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>53</sub> [M+Na+] 2172.6995, found, 2172.7084

**【0045】**

参考例4 化合物4および8の合成

参考例3で得られた化合物3および7の混合物 (90mg, 47.3  $\mu$ mol

) をそれぞれ分離することなく、ウシ血清アルブミン 8mg と共に HEPES 緩衝溶液 (50mM, pH 6.0) 8.1ml に溶解させ、さらに Bovine kidney 由来  $\beta$ -グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Bovine kidney) を 2.88U 加えた。この溶液を 37℃ で 18 時間静置した後凍結乾燥し、残留物を HPLC (ODS カラム、2.0  $\phi$   $\times$  25 cm、展開溶媒は 50mM 酢酸アンモニウム水溶液: メタノール = 65:35、流速 3ml/min) で精製したところ、117 分後に化合物 4 が、127 分後に化合物 8 が溶出した。それぞれを取り分け、凍結乾燥を行った。続いて HPLC (ODS カラム、2.0  $\phi$   $\times$  25 cm、展開溶媒は最初の 15 分間が水、16 分後から 30 分後までは水: アセトニトリル = 10:0 から 85:15、31 分後から 45 分後までは水: アセトニトリル = 85:15 から 80:20 になるようにグラジエントを掛けた。流速は 3.0ml/min) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 4 が 40mg、化合物 8 が 37mg 得られた。

#### 【0046】

なお、得られた化合物 4 の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30℃)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.22 (1H, s, Man4-H1), 5.08 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.94 (1H, s, Man4'-H1), 4.84 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (1H, d, GlcNAc5-H1), 4.55 (1H, d, Gal6-H1), 4.33 (1H, dd, Man3-H2), 4.20 (1H, dd, Man4-H2), 4.15 (1H, dd, Man4'-H2), 2.97 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7,7'-H3eq), 2.62 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (12H, s  $\times$  4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7,7'-H3ax); HRMS Calcd for  $\text{C}_{78}\text{H}_{114}\text{N}_6\text{NaO}_{48}$  [M+Na+] 1925.6562, found, 1925.6539

#### 【0047】

また、得られた化合物8の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6,6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 2.97 (1H, bdd, Asn- $\beta\text{CH}_2$ ), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H3eq), 2.61 (1H, bdd, Asn- $\beta\text{CH}_2$ ), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7'-H3ax); HRMS Calcd for  $\text{C}_{78}\text{H}_{114}\text{N}_6\text{NaO}_{48}$   $[\text{M}+\text{Na}^+]$  1925.6562, found, 1925.6533

#### 【0048】

##### 参考例5 化合物5の合成

参考例4で得られた化合物4 (30mg,  $473\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン3mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 6mlに溶解させ、さらにJack Beans由来 $\alpha$ -マンノシダーゼを10U加えた。この溶液を $37^\circ\text{C}$ で21時間静置した後凍結乾燥し、続いてHPLC (ODSカラム、 $2.0\phi\times 25\text{cm}$ 、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水:アセトニトリル=10:0から85:15、31分後から45分後までは水:アセトニトリル=85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は $3.0\text{ml}/\text{min}$ .)を用いて精製したところ、目的とする化合物5が20mg得られた。

#### 【0049】

なお、得られた化合物5の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (

4H, m, Fmoc), 5.00 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.84 (1H, s, Man3-H1), 4.67 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.56 (1H, d, GlcNAc5-H1), 4.44 (1H, d, Gal6-H1), 4.11 (1H, dd, Man4'-H2), 4.07 (1H, dd, Man3-H2), 2.97 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H3eq), 2.62 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7'-H3ax); HRMS Calcd for C<sub>72</sub>H<sub>104</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>43</sub> [M+Na+] 1763.6034, found, 1763.6074

#### 【0050】

##### 参考例6 化合物9の合成

参考例4で得られた化合物8 (40mg, 630 $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン5gをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 7.8mlに溶解させ、Jack Beans由来 $\alpha$ -マンノシダーゼを38U加えた。この溶液を37℃で63時間静置した後凍結乾燥し、続いてHPLCC (ODSカラム、2.0 $\phi$  $\times$ 25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水:アセトニトリル=10:0から85:15、31分後から45分後までは85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min) を用いて精製したところ、目的とする化合物9が30mg得られた。

#### 【0051】

なお、得られた化合物9の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 30℃)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.23 (1H, s, Man4-H1), 5.08 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.53 (1H, d, Gal6-H1), 4.32 (1H, dd, Man3-H2), 4.28 (1H, dd, Man4-H2), 2.81 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H3eq), 2.59 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.13 (12

H, s×4, -Ac), 1.80 (1H, dd, NeuAc7H3ax); HR  
MS Calcd for C<sub>72</sub>H<sub>104</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>43</sub> [M+Na+] 17  
63.6034, found, 1763.6041

## 【0052】

## 参考例7 Fmoc基の脱保護（化合物33の合成）

参考例2で得られた化合物10（10.5mg, 5.27μmol）を50%モ  
ルホリン／N,N-ジメチルホルムアミド溶液1.4mlに溶解させ、室温・アル  
ゴン雰囲気下で2時間反応させた。この溶液にトルエン3mlを加え、35℃で  
エバポレーターに供した。この操作を三回繰り返し、反応溶媒を取り除いた。残  
留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー（Sephadex G-25、2.  
5φ×30cm、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min.）で精製したとこ  
ろ、目的とする化合物33が7mg得られた（収率は76%）。なお、得られた  
化合物の構造は、参考例2から得られる化合物33と<sup>1</sup>H-NMRスペクトルが  
一致したことから確認した。

## 【0053】

化合物33の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J=9.7Hz,  
GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1),  
4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 1H, J=8.0Hz,  
GlcNAc2-H-1), 4.58 (d, 2H, J=7.8Hz, GlcNAc  
5,5'-H-1), 4.47 (d, 2H, J=7.9Hz, Gal6,6'-H  
-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H,  
J=3.2Hz, 1.4Hz, Man4'-H-2), 4.12 (bdd, 1H,  
J=3.2Hz, 1.4Hz, Man4-H-2), 2.93 (dd, 1H, J=  
4.5Hz, 17.0Hz, Asn-βCH), 2.93 (dd, 1H, J=6.8  
Hz, 17.0Hz, Asn-βCH), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.05  
(s, 6H, Ac×2), 2.01 (s, 3H, Ac)

## 【0054】

## 参考例8 化合物14の合成

化合物3 (28mg, 21.3  $\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.0mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 454  $\mu\text{L}$ ) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 198mU) を加えた。この溶液を37℃で20時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5S-5 120A ODS No.2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシール75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物14 (17mg, 収率70%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

## 【0055】

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

$\delta$  7.91 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 1H, J=8.0Hz, GlcNAc2-H-1), 4.55 (d, 1H, J=8.4Hz, GlcNAc5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=7.8Hz, Gal6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bd, 1H, J=1.9Hz, Man3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, J=1.4Hz, 3.3Hz, Man4-H-2), 4.11 (bdd, 1H, J=1.4Hz, 3.5Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=3.0Hz, 15.7Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.7Hz, 15.7Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.06, 2.05, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Ca



1 c d f o r C<sub>75</sub>H<sub>110</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>45</sub> [M+Na<sup>+</sup>] 1837.64  
02, f o u n d 1837.6471

【0056】

参考例9 化合物19の合成

化合物7 (20mg, 9.4  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン1.6mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 323  $\mu$ L) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 141mU) を加えた。この溶液を37℃で18時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いてHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物19 (13mg, 収率76%) を得た。得られた化合物の構造は<sup>1</sup>H-NMRが標品と一致したことから確認した。

【0057】

参考例10 化合物15の合成

化合物4 (45mg, 24  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン1.7mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 820  $\mu$ L) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 134mU) を加えた。この溶液を37℃で14時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物15 (28mg, 収率74%) が得られた。得られた化合

物の物理的データは以下の通りである。

【0058】

$^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  7.92 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.51 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.44 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 2H, GlcNAc2,5'-H-1), 4.47 (d, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ , Gal6'-H-1), 4.35 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bd, 1H,  $J=1.9\text{ Hz}$ , Man3-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.52 (dd, 1H,  $J=8.7\text{ Hz}$ ,  $15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.06, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for  $\text{C}_{67}\text{H}_{97}\text{N}_5\text{NaO}_{40}$  [ $\text{M}+\text{Na}+$  1634.5608, found, 1634.5564]

【0059】

参考例11 化合物70の合成

化合物15 (11mg,  $6.8\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.5mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0,  $269\text{ }\mu\text{L}$ ) に溶解させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans,  $11\text{ }\mu\text{L}$ ,  $275\text{ mU}$ ) を加えた。この溶液を37℃で14時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、 $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速 $4\text{ mL/min}$ ) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、 $15\times 100\text{ mm}$ 、最初に $\text{H}_2\text{O}$ を50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とす

る化合物70 (6.3 mg, 収率64%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

【0060】

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  7.91 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.70 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.50 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.43 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc2,5'-H-1), 4.32 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man4-H-2), 4.06 (bs, 1H,  $J=1.3\text{ Hz}$ , Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=14.0\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.52 (bdd, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ ,  $14.8\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.06, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{61}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{35}$   $[\text{M}+\text{H}^+]$  1450.5, found, 1450.4

【0061】

参考例12 化合物20の合成

化合物8 (47 mg,  $25\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.9 mgをHEPES緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0,  $840\text{ }\mu\text{L}$ ) に溶解させ、ノイラミダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 369 mU) を加えた。この溶液を37°Cで37時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液を凍結乾燥し、続いてHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、 $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速 $4\text{ mL/min}$ ) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、 $15\times 100\text{ mm}$ 、最初に $\text{H}_2\text{O}$ を50 mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩

したところ、目的とする化合物20 (26 mg, 収率65%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

【0062】

$^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  7.92 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.51 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.43 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.4\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (bd, 2H, GlcNAc2,5'-H-1), 4.46 (d, 1H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Gal6'-H-1), 4.34 (t, 3H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.52 (bdd, 1H,  $J=9.2\text{ Hz}$ ,  $15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.06, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for  $\text{C}_{67}\text{H}_{97}\text{N}_5\text{NaO}_{40}$   $[\text{M}+\text{Na}^+]$  1634.5608, found, 1634.5644

【0063】

参考例13 化合物71の合成

化合物20 (12 mg,  $7.4\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.0 mgをHEPES緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0,  $330\text{ }\mu\text{L}$ ) に溶解させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans,  $12\text{ }\mu\text{L}$ ,  $297\text{ mU}$ ) を加えた。この溶液を37℃で46時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、 $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速 $4\text{ mL/min}$ ) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、 $15\times 100\text{ mm}$ 。最初に $\text{H}_2\text{O}$ を50 mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とす

る化合物 71 (6.6 mg, 収率 61%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

【0064】

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  7.90 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.70 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.49 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.42 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.4\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc2,5-H-1), 4.31 (b, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4-H-2), 3.97 (dd, 1H,  $J=1.8\text{ Hz}$ , 3.3 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.52 (bdd, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ , 15.5 Hz, Asn- $\beta\beta\text{CH}$ ), 2.06, 2.05, 1.88 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{61}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{35} [\text{M}+\text{H}^+]$  1450.5, found, 1450.3

【0065】

参考例 14 化合物 16 の合成

化合物 5 (32 mg,  $18.4\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン 2.5 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0,  $713\text{ }\mu\text{L}$ ) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 134 mU) を加えた。この溶液を 37°C で 17 時間静置した後、HPLC 分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液を HPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2 020178、 $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル = 80：20、流速  $4\text{ mL/min}$ ) で精製した。更に ODS カラム (コスモシル 75C18-OPN、 $15\times 100\text{ mm}$ 、最初に  $\text{H}_2\text{O}$  を 50 mL 流し、次に 25% アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したとこ

ろ、目的とする化合物16 (13 mg, 収率52%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

【0066】

$^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  7.92 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.51 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.44 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.00 (d, 1H,  $J=9.9\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , GlcNAc2,5'-H-1), 4.47 (d, 1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , Gal6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.10 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4'-H-2), 2.72 (bdd, 1H,  $J=15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.52 (bdd, 1H,  $J=9.2\text{ Hz}$ ,  $15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.07, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{61}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{35}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1450.5, found, 1450.3

【0067】

参考例15 化合物17の合成

化合物16 (9 mg,  $6.2\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.6 mgをHEPES緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0,  $613\text{ }\mu\text{L}$ ) に溶解させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans, 186 mU) を加えた。この溶液を37℃で32時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、 $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4 mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75 C18-OPN、 $15\times 100\text{ mm}$ 、最初に $\text{H}_2\text{O}$ を50 mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物17

(5.4 mg, 収率68%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

【0068】

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  7.89 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.68 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.49 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.42 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 4.99 (d, 1H,  $J=9.7\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.55 (d, 1H,  $J=8.1\text{ Hz}$ , GlcNAc2,5'-H-1), 4.09, 4.07 (s, 1H, Man4'-H-2, Man3-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta$ CH), 2.56 (bdd, 1H,  $J=8.1\text{ Hz}$ , 15.5 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{55}\text{H}_{77}\text{N}_5\text{NaO}_{30}$  [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ] 1310.5, found, 1310.2

【0069】

参考例16 化合物18の合成

化合物17 (3.4 mg,  $2.6\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.1 mgをHEPES緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0,  $257\text{ }\mu\text{L}$ ) に溶解させ、N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ from Jack Beans, 144 mU), 加えた。この溶液を37°Cで24時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178,  $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル=80:20、流速 $4\text{ mL/min}$ ) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN,  $15\times 100\text{ mm}$ 。最初に $\text{H}_2\text{O}$ を50 mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物18 (2.1 mg, 収率75%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

## 【0070】

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5 Hz, 7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, 7.5 Hz, Fmoc), 5.00 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (d, 1H, J=1.6 Hz, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 1H, J=7.8 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.07 (d, 1H, J=2.7 Hz, Man4'-H-2), 3.97 (dd, 1H, J=1.6 Hz, 3.7 Hz, Man3-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=3.2 Hz, 15.1 Hz, Asn-βCH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.9 Hz, 15.1 Hz, Asn-βCH), 2.07, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (FAB), Calcd for C<sub>47</sub>H<sub>65</sub>N<sub>4</sub>O<sub>25</sub> [M+Na<sup>+</sup>] 1085.4, found, 1085.3

## 【0071】

参考例 17 化合物 21 の合成

化合物 9 (28 mg, 16 μmol) とウシ血清アルブミン 1.7 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 624 μL) に溶解させ、ノイラミダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 117 mU) を加えた。この溶液を 37℃ で 17 時間静置した後、HPLC 分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液を HPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250 mm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速 4 mL/min) で精製した。更に ODS カラム (コスモシール 75C18-OPN、15×100 mm。最初に H<sub>2</sub>O を 50 mL 流し、次に 25% アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物 21 (14.6 mg, 収率 68%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。



## 【0072】

$^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  7.92 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.50 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.43 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (d, 2H,  $J=7.2\text{ Hz}$ , GlcNAc2-H-1), 4.46 (d, 1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , Gal6-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (bd, 1H,  $J=2.7\text{ Hz}$ , Man3-H-2), 4.19 (b, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bdd, 1H,  $J=15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.52 (bdd, 1H,  $J=9.8\text{ Hz}$ ,  $15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.05 (s, 6H, Ac $\times 2$ ), 1.89 (s, 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{61}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{35}$  [M+H $^+$ ] 1450.5, found, 1450.3

## 【0073】

参考例18 化合物22の合成

化合物21 (10mg,  $6.9\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.6mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0,  $672\text{ }\mu\text{L}$ ) に溶解させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans, 205mU) を加えた。この溶液を37℃で20時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、 $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシル7 5C18-OPN、 $15\times 100\text{ mm}$ 、最初に $\text{H}_2\text{O}$ を50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物22 (5.6mg, 収率64%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

## 【0074】

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.87 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.67 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.48 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.41 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, J=8.6 Hz, GlcNAc2, 5-H-1), 4.26 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (d, 1H, J=2.2 Hz, Man3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, J=1.3 Hz, 3.3 Hz, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-βCH), 2.54 (bdd, 1H, J=9.5 Hz, 15.5 Hz, Asn-βCH), 2.05 (s, 6H, Ac×2), 1.88 (s, 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for C<sub>55</sub>H<sub>78</sub>N<sub>5</sub>O<sub>30</sub> [M+H<sup>+</sup>] 1288.5, found, 1288.3

## 【0075】

## 参考例19 化合物23の合成

化合物22 (3.6 mg, 2.8 μmol) とウシ血清アルブミン1.2 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 277 μL) に溶解させ、N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ from Jack Beans, 195 mU) を加えた。この溶液を37℃で24時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250 mm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=80:20、流速4 mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、15×100 mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50 mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物23 (2.3 mg, 収率77%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

## 【0076】

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  7.91 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.70 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.50 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.43 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.7\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (d, 1H,  $J=6.5\text{ Hz}$ , GlcNAc-H-1), 4.33 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (d, 1H,  $J=3.0\text{ Hz}$ , Man3-H-2), 4.07 (bdd, 1H,  $J=2.1\text{ Hz}$ , Man4-H-2), 2.72 (bdd, 1H,  $J=15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.52 (bdd, 1H,  $J=8.9\text{ Hz}$ ,  $15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{47}\text{H}_{65}\text{N}_4\text{O}_{25} [\text{M}+\text{H}^+]$  1085.4, found, 1085.3

## 【0077】

## 参考例20 化合物11の合成

化合物10 (123mg,  $62\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン (1.1mg) をHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 2.5mL) に溶解させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans,  $24\text{ }\mu\text{L}$ , 612mU) を加えた。この溶液を37°Cで61時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液を凍結乾燥し、続いてHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、 $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速 $3.5\text{ mL/min}$ ) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、 $15\times 100\text{ mm}$ 。最初に $\text{H}_2\text{O}$ を50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物11 (71mg, 収率70%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

## 【0078】

 $^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  7.91 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (1H, d,  $J=9.9$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H,  $J=8.6$  Hz, GlcNAc2, 5-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (s, 1H, Man4-H-2), 4.10 (s, 1H, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=15.5$  Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.51 (bdd, 1H,  $J=9.0$  Hz, 15.5 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H,  $Ac \times 2$ ), 1.88 (s, 3H, Ac); HRMS Calcd for  $C_{69}H_{100}N_6NaO_{40}$  [M+Na+] 1675.5873, found, 1675.5841

#### 【0079】

##### 参考例21 化合物12の合成

化合物11 (50 mg,  $30 \mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン 2.0 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0,  $920 \mu\text{L}$ ) に溶解させ、N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans, 2.1 U) を加えた。この溶液を  $37^\circ\text{C}$  で 48 時間静置した後、HPLC 分析により反応終了を確認した。反応溶液を HPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、 $20 \times 250$  mm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル = 80 : 20、流速  $4 \text{ mL/min}$ ) で精製し、凍結乾燥を行った。この残留物を ODS カラム (コスモシル 75C18-OPN、 $15 \times 100$  mm、最初に  $\text{H}_2\text{O}$  を 50 mL 流し、次に 25% アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物12 (25 mg, 収率 66%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

#### 【0080】

$^1\text{H-NMR}$  ( $30^\circ\text{C}$ )

$\delta$  7.91 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.7$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (bd, 1H,  $J=1.6$  Hz, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58~4.52 (b, 1H, GlcNAc2-H-1), 4.33 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.06 (dd, 1H,  $J=1.6$  Hz, 3.2 Hz, Man4-H-2), 3.97 (dd, 1H,  $J=1.6$  Hz, 3.5 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=15.5$  Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.53 (bdd, 1H,  $J=9.0$  Hz, 15.5 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.05, 1.88 (each s, each 3H, Ac),

#### 【0081】

#### 参考例22 化合物13の合成

化合物12 (10 mg, 11  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン0.9 mgをH E P E S緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 440  $\mu$ L) に溶解させ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans, 30  $\mu$ L, 3.2 U) を加えた。この溶液を37℃で21時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いてHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、20×250 mm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4 mL/min) で精製を行った。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、15×100 mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50 mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物13 (3 mg, 収率43%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

#### 【0082】

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

$\delta$  7.92 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J=$

7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 4.99 (d, 1H,  $J=9.5$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (1H, GlcNAc2-H-1), 4.06 (d, 1H,  $J=3.2$  Hz, Man3-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=15.5$  Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.52 (bdd, 1H,  $J=8.3$  Hz, 15.5 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac),

### 【0083】

(糖鎖アスパラギン誘導体のFmoc基の脱保護)

全ての糖鎖アスパラギン誘導体において、以下の手順でFmoc基の脱保護を行った。まず、糖鎖アスパラギンFmoc体1  $\mu$ molあたりに240  $\mu$ LのN,N-ジメチルホルムアミド、160  $\mu$ Lのモルホリンを加え、室温・アルゴン雰囲気下で反応させた。TLC (展開溶媒として1M 酢酸アンモニウム:イソプロパノール=8:5を用いた) にて反応終了を確認した後、氷水で冷却した。ここにジエチルエーテルを反応溶液の10倍量加えて15分間攪拌した後、析出した沈殿物をろ別した。得られた残渣を水に溶解させ、35℃でエバポレートした。更にトルエンを3 mL加えエバポレートするという操作を三回繰り返した。残留物を逆相カラムクロマトグラフィー (コスモシル75C18-OPN、15  $\times$  100 mm、展開溶媒は水) により精製した。

### 【0084】

参考例23 化合物33の合成

化合物10 (10.5 mg, 5.3  $\mu$ mol) を上記の操作で7時間反応させたところ、目的とする化合物33 (7 mg, 収率76%) が得られた。得られた化合物は $^1$ H-NMRが標品と一致したことから確認した。

### 【0085】

参考例24 化合物26の合成

化合物3 (8.0 mg, 3.8  $\mu$ mol) を上記の操作で21時間反応させたところ、目的とする化合物26 (6.3 mg, 収率88%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  5.13 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.9\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (2H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.56 (d, 1H,  $J=8.1\text{ Hz}$ , GlcNAc5-H-1), 4.52 (d, 1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , Gal6'-H-1), 4.25 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.12 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.94 (dd, 1H,  $J=4.5\text{ Hz}$ ,  $17.0\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.85 (dd, 1H,  $J=6.8\text{ Hz}$ ,  $17.0\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.68 (dd, 1H,  $J=4.6\text{ Hz}$ ,  $12.4\text{ Hz}$ , NeuAc7'-H-3eq), 2.08, 2.07, 2.06, 2.04, 2.02 (each s, each 3H, Ac), 1.72 (dd, 1H,  $J=12.1\text{ Hz}$ ,  $12.1\text{ Hz}$ , NeuAc7'-H-3ax); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{71}\text{H}_{118}\text{N}_7\text{O}_{51} [\text{M}+\text{H}^+]$  1884.7, found, 1884.5

## 【0086】

## 参考例25 化合物27の合成

化合物4 (11.0mg,  $5.8\text{ }\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で23時間反応させたところ、目的とする化合物27 (8.5mg, 収率88%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

 $^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.08 (d, 1H,  $J=9.7\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 2H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.45 (d, 1H,  $J=7.6\text{ Hz}$ , Gal6'-H-1), 4.26 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.12 (bd, 1H, Man4'-H-2), 4.08 (bdd, 1H,  $J=1.6\text{ Hz}$ ,  $3.3\text{ Hz}$ , Man4-H-2), 2.94 (dd, 1H,  $J=4.0\text{ Hz}$ ,  $17.2\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.85 (dd, 1H,  $J=7.2\text{ Hz}$ ,  $17.2\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ )

), 2.68 (dd, 1H,  $J=4.1\text{ Hz}$ ,  $12.1\text{ Hz}$ , NeuAc 7' -H-3eq), 2.09, 2.07, 2.04, 2.02 (each s, each 3H, Ac), 1.72 (dd, 1H,  $J=12.1\text{ Hz}$ ,  $12.1\text{ Hz}$ , NeuAc 7' -H-3ax), ;MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{63}\text{H}_{104}\text{N}_6\text{NaO}_{46}$   $[\text{M}+\text{Na}^+]$  1703.6, found, 1703.1

## 【0087】

## 参考例26 化合物28の合成

化合物5 (7.0mg,  $4.0\text{ }\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で21時間反応させたところ、目的とする化合物28 (5.3mg, 収率87%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $30^\circ\text{C}$ )

$\delta$  5.07 (d, 1H,  $J=9.4\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.94 (s, 1H, Man 4' -H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61, 4.59 (each d, each 1H, GlcNAc 2,5' -H-1), 4.44 (d, 1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , Gal 6' -H-1), 4.10, 4.07 (each 1H, Man 4', 3-H-2), 2.93 (dd, 1H,  $J=4.6\text{ Hz}$ ,  $17.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.85 (dd, 1H,  $J=7.0\text{ Hz}$ ,  $17.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.67 (dd, 1H,  $J=4.6\text{ Hz}$ ,  $12.2\text{ Hz}$ , NeuAc 7' -H-3eq), 2.08, 2.06, 2.02, 2.01 (each s, each 3H, Ac), 1.71 (2H, dd,  $J=12.2\text{ Hz}$ ,  $12.2\text{ Hz}$ , NeuAc 7' -H-3ax); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{57}\text{H}_{94}\text{N}_6\text{NaO}_{41}$   $[\text{M}+\text{Na}^+]$  1541.5, found, 1541.3

## 【0088】

## 参考例27 化合物30の合成

化合物7 (13.9mg,  $6.6\text{ }\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で7時間反応させたところ、目的とする化合物30 (8.0mg, 収率64%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $30^\circ\text{C}$ )



$\delta$  5.13 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.9$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.60 (each d, each 1H,  $J=8.0$  Hz, GlcNAc2,5-H-1), 4.55 (d, 1H,  $J=8.4$  Hz, GlcNAc5'-H-1), 4.44 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz, Gal6-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H,  $J=1.3$  Hz, 3.2 Hz, Man4'-H-2), 4.10 (bdd, 1H,  $J=1.4$  Hz, 3.2 Hz, Man4-H-2), 2.90 (dd, 1H,  $J=4.5$  Hz, 16.7 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.80 (dd, 1H,  $J=7.5$  Hz, 16.7 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.66 (dd, 1H,  $J=4.6$  Hz, 12.4 Hz, NeuAc7-H-3eq), 2.07, 2.06, 2.05, 2.02, 2.01 (each s, each 3H, Ac), 1.71 (dd, 1H,  $J=12.4$  Hz, 12.4 Hz, NeuAc7-H-3ax); MS (Fab), Calcd for  $C_{71}H_{117}N_7NaO_{51}$  [M+Na+] 1906.7, found, 1906.1

#### 【0089】

##### 参考例28 化合物31の合成

化合物8 (8.0 mg,  $4.2 \mu\text{mol}$ ) を上記の操作で12時間反応させたところ、目的とする化合物31 (6.0 mg, 収率86%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

##### $^1\text{H-NMR}$ (30°C)

$\delta$  5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.5$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.59 (each d, each 1H, GlcNAc2,5-H-1), 4.43 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz, Gal6-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, Man4'-H-2), 2.91 (bd, 1H,  $J=17.0$  Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.81 (dd, 1H,  $J=6.5$  Hz, 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.66 (dd, 1H,  $J=4.6$  Hz, 12.6 Hz,

NeuAc7-H-3eq), 2.06, 2.06, 2.02, 2.00 (each s, each 3H, Ac), 1.70 (dd, 1H,  $J=12.6$  Hz, 12.6 Hz, NeuAc7-H-3ax); MS (Fab), Calcd for  $C_{63}H_{104}N_6NaO_{46}$   $[M+Na^+]$  1703.6, found, 1703.0

#### 【0090】

##### 参考例29 化合物32の合成

化合物9 (7.7 mg,  $4.4 \mu\text{mol}$ ) を上記の操作で23時間反応させたところ、目的とする化合物32 (5.2 mg, 収率78%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

##### $^1\text{H-NMR}$ (30°C)

$\delta$  5.14 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.4$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.60 (each d, each 1H, GlcNAc2,5-H-1), 4.44 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz, Gal6-H-1), 4.23 (d, 1H,  $J=3.0$  Hz, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H,  $J=1.3$  Hz, 2.9 Hz, Man4-H-2), 2.92 (dd, 1H,  $J=4.1$  Hz, 17.2 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.83 (dd, 1H,  $J=7.5$  Hz, 12.7 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.67 (dd, 1H,  $J=4.6$  Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H-3eq), 2.06 (s, 6H,  $\text{Ac} \times 2$ ), 2.03, 2.01 (each s, each 3H, Ac), 1.71 (dd, 1H,  $J=12.7$  Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H-3ax); MS (Fab), Calcd for  $C_{57}H_{94}N_6NaO_{41}$   $[M+Na^+]$  1541.5, found, 1541.2

#### 【0091】

##### 参考例30 化合物37の合成

化合物14 (9.1 mg,  $5.0 \mu\text{mol}$ ) を上記の操作で13時間反応させたところ、目的とする化合物37 (6.5 mg, 収率77%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57, 4.55 (each d, each 1H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , GlcNAc2,5,5'-H-1), 4.46 (d, 1H,  $J=7.3\text{ Hz}$ , Gal6'-H-1), 4.23 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.87 (dd, 1H,  $J=4.8\text{ Hz}$ ,  $17.0\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.76 (dd, 1H,  $J=7.2\text{ Hz}$ ,  $17.0\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 6H,  $\text{Ac}\times 2$ ), 2.00 (s, 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{60}\text{H}_{100}\text{N}_6\text{NaO}_{43}$   $[\text{M}+\text{Na}^+]$  1615.6, found, 1615.0

## 【0092】

## 参考例31 化合物42の合成

化合物19 (9.8mg,  $5.4\text{ }\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で13時間反応させたところ、目的とする化合物42 (8.0mg, 収率88%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

 $^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.60, 4.57, 4.55 (each d, each 1H, GlcNAc2,5,5'-H-1), 4.46 (d, 1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , Gal6-H-1), 4.28 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (s, 1H, Man4'-H-2), 4.10 (s, 1H, Man4-H-2), 2.88 (dd, 1H,  $J=4.0\text{ Hz}$ ,  $16.6\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.77 (dd, 1H,  $J=7.5\text{ Hz}$ ,  $16.6\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 6H,  $\text{Ac}\times 2$ ), 2.00 (s, 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{60}\text{H}_{100}$

$1\text{N}_6\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1593.6, found, 1593.8

【0093】

### 参考例 32 化合物 38 の合成

化合物 15 (5.1 mg,  $3.2\ \mu\text{mol}$ ) を上記の操作で 11 時間反応させたところ、目的とする化合物 38 (4.0 mg, 収率 91%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.10 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.4\ \text{Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H,  $J=7.8\ \text{Hz}$ , GlcNAc 2, 5'-H-1), 4.47 (d, 1H,  $J=7.8\ \text{Hz}$ , Gal 6'-H-1), 4.24 (d, 1H,  $J=2.3\ \text{Hz}$ , Man 3-H-2), 4.10, 4.06 (each bd, each 1H, Man 4', 4-H-2), 2.90 (dd, 1H,  $J=4.2\ \text{Hz}$ , 16.8 Hz, Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.81 (dd, 1H,  $J=7.3\ \text{Hz}$ , 16.8 Hz, Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.07, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{52}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{38}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1390.5, found, 1390.1

【0094】

### 参考例 33 化合物 72 の合成

化合物 70 (4.0 mg,  $2.8\ \mu\text{mol}$ ) を上記の操作で 13 時間反応させたところ、目的とする化合物 72 (2.9 mg, 収率 85%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.09 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.8\ \text{Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61, 4.54 (each d, each 1H, GlcNAc 2, 5-H-1), 4.24 (s, 1H, Man 3-H-2), 4.10, 4.06 (each bs, each 1H, Man 4

, 4' -H-2), 2.87 (dd, 1H,  $J=17.2\text{ Hz}$ , Asn- $\beta$ CH), 2.76 (dd, 1H,  $J=6.5\text{ Hz}$ , 17.2 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07, 2.04, 2.00 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_{33}$  [M+H+] 1228.5, found, 1228.3

## 【0095】

## 参考例34 化合物43の合成

化合物20 (5.4 mg,  $3.3\text{ }\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で11時間反応させたところ、目的とする化合物43 (4.1 mg, 収率87%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.46 (d, 1H, Gal6-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.90 (dd, 1H,  $J=4.0\text{ Hz}$ , 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.80 (dd, 1H,  $J=7.3\text{ Hz}$ , 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{52}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{38}$  [M+H+] 1390.5, found, 1390.2

## 【0096】

## 参考例35 化合物73の合成

化合物71 (4.0 mg,  $2.8\text{ }\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で13時間反応させたところ、目的とする化合物73 (2.9 mg, 収率85%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.9\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1),

4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.60, 4.54 (each d, each 1H,  $J=7.9\text{ Hz}$ , GlcNAc2,5-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (dd, 1H,  $J=1.6\text{ Hz}$ , 1.6 Hz, Man4-H-2), 3.96 (1H, dd,  $J=1.6\text{ Hz}$ , 1.6 Hz, Man4-H-2), 2.88 (dd, 1H,  $J=4.3\text{ Hz}$ , 16.8 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.77 (dd, 1H,  $J=7.2\text{ Hz}$ , 16.8 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.06, 2.04, 2.00 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_{33} [\text{M}+\text{H}^+]$  1228.5, found, 1228.3

## 【0097】

## 参考例36 化合物39の合成

化合物16 (2.2 mg,  $1.5\text{ }\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で7時間反応させたところ、目的とする化合物39 (1.6 mg, 収率84%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.07 (d, 1H,  $J=9.7\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62, 4.58 (each d, each 1H, GlcNAc2,5-H-1), 4.09, 4.08 (each s, each 1H, Man3,4'-H-2), 2.91 (dd, 1H,  $J=4.1\text{ Hz}$ , 16.9 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.81 (dd, 1H,  $J=6.8\text{ Hz}$ , 16.9 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.08, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{77}\text{N}_5\text{NaO}_{33} [\text{M}+\text{Na}^+]$  1250.4, found, 1250.3

## 【0098】

## 参考例37 化合物40の合成

化合物17 (1.5 mg,  $1.2\text{ }\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で14時間反応させたところ、目的とする化合物40 (1.1 mg, 収率89%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 5.07 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.62, 4.55 (each d, each 1H, GlcNAc 2,5-H-1), 4.10, 4.07 (each s, each 1H, Man 4', 3-H-2), 2.89 (dd, 1H, J=3.7 Hz, 17.0 Hz, Asn-βCH), 2.79 (dd, 1H, J=7.0 Hz, 17.0 Hz, Asn-βCH), 2.07, 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for C<sub>40</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>28</sub> [M+Na<sup>+</sup>] 1088.4, found, 1088.2

【0099】

#### 参考例 38 化合物 41 の合成

化合物 18 (1.3 mg, 1.2 μmol) を上記の操作で 14 時間反応させたところ、目的とする化合物 41 (0.8 mg, 収率 80%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 5.07 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.62 (d, 1H, J=7.8 Hz, GlcNAc 2-H-1), 4.08 (d, 1H, J=2.9 Hz, Man 3-H-2), 2.92 (dd, 1H, J=3.9 Hz, 17.3 Hz, Asn-βCH), 2.83 (dd, 1H, J=7.0 Hz, 17.3 Hz, Asn-βCH), 2.07, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>55</sub>N<sub>4</sub>O<sub>27</sub> [M+H<sup>+</sup>] 863.3, found 863.2

【0100】

#### 参考例 39 化合物 44 の合成

化合物 21 (2.3 mg, 1.6 μmol) を上記の操作で 7 時間反応させたところ、目的とする化合物 44 (1.6 mg, 収率 84%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.8\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H, GlcNAc2,5-H-1), 4.46 (d, 1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , Gal-H-1), 4.22, 4.18 (each bs, each 1H, Man3,4-H-2), 2.91 (dd, 1H,  $J=4.1\text{ Hz}$ ,  $17.3\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.82 (dd, 1H,  $J=7.0\text{ Hz}$ ,  $17.3\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.05, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_{33}$   $[\text{M}+\text{H}^+]$  1228.5, found, 1228.3

## 【0101】

## 参考例 40 化合物 45 の合成

化合物 22 (1.6 mg,  $1.3\text{ }\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で 14 時間反応させたところ、目的とする化合物 45 (1.1 mg, 収率 85%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

 $^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.7\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.54 (each d, each 1H, GlcNAc2,5-H-1), 4.22 (d, 1H,  $J=2.5\text{ Hz}$ , Man3-H-2), 4.18 (dd, 1H,  $J=1.4\text{ Hz}$ ,  $3.0\text{ Hz}$ , Man4'-H-2), 2.89 (dd, 1H,  $J=4.3\text{ Hz}$ ,  $16.9\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.78 (dd, 1H,  $J=7.5\text{ Hz}$ ,  $16.9\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.06, 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{40}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{NaO}_{28}$   $[\text{M}+\text{Na}^+]$  1088.4, found, 1088.3

## 【0102】

## 参考例 41 化合物 46 の合成



化合物 23 (1.6 mg, 1.5  $\mu$ mol) を上記の操作で 14 時間反応させたところ、目的とする化合物 46 (1.1 mg, 6.4  $\mu$ mol, 収率 85%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.10 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61 (d, 1H,  $J=7.3\text{ Hz}$ , GlcNAc 2-H-1), 4.22 (d, 1H,  $J=2.4\text{ Hz}$ , Man 3-H-2), 4.07 (dd, 1H,  $J=1.6\text{ Hz}$ , 3.0 Hz, Man 4'-H-2), 2.90 (dd, 1H,  $J=4.3\text{ Hz}$ , 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.80 (dd, 1H,  $J=7.0\text{ Hz}$ , 17.2 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_{23}$  [M+H+] 863.3, found 863.3

【0103】

#### 参考例 42 化合物 34 の合成

化合物 11 (12.4 mg, 7.5  $\mu$ mol) を上記の操作で 11 時間反応させたところ、目的とする化合物 34 (9.2 mg, 収率 86%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.11 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=10.0\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61 (d, 1H,  $J=6.8\text{ Hz}$ , GlcNAc 2-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc 5, 5'-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man 3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man 4'-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man 4-H-2), 2.80 (dd, 1H,  $J=3.8\text{ Hz}$ , 15.6 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.63 (dd, 1H,  $J=8.2\text{ Hz}$ , 15.6 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H,  $\text{Ac} \times 2$ ), 2.01 (s, 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{NaO}_{38}$  [M+Na+] 1

453.5, found, 1453.2

【0104】

参考例43 化合物35の合成

化合物12 (12.0 mg, 8.4  $\mu$ mol) を上記の操作で11時間反応させたところ、目的とする化合物35 (7.0 mg, 収率81%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30 $^{\circ}\text{C}$ )

$\delta$  5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.7\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ , GlcNAc2-H-1), 4.25 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.06 (bs, 1H, Man4'-H-2), 3.97 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.79 (dd, 1H,  $J=5.0\text{ Hz}$ , 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.61 (dd, 1H,  $J=7.3\text{ Hz}$ , 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{65}\text{N}_4\text{O}_{28}$   $[\text{M}+\text{H}^+]$  1025.4, found, 1025.2

【0105】

参考例44 化合物36の合成

化合物13 (8.4  $\mu$ mol) を上記の操作で11時間反応させたところ、目的とする化合物36で得られた。

【0106】

参考例45 化合物76、77の合成および単離

化合物2、6 (5.0 mg, 2.2  $\mu$ mol) を220  $\mu$ Lの水に溶解させ、2 mMの炭酸セシウム水溶液を100  $\mu$ L加え、pH7.0とした。この溶液を凍結乾燥した。乾燥後の固形物にN,N-ジメチルホルムアミドを430  $\mu$ L加え、更に6.6  $\mu$ molのベンジルプロマイド/N,N-ジメチルホルムアミド溶液を20  $\mu$ L加えた。この溶液をアルゴン雰囲気下で攪拌した。48時間後、TLC (展開溶媒は1M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ :イソプロパノール=2:1を用いた) に

て原料の消失を確認した後、4.4 mL のジエチルエーテルを加えて化合物を沈殿させた。沈殿した糖鎖を濾過し、残った糖鎖を水に溶解させ凍結乾燥した。凍結乾燥後の残留物を分取 HPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、20×250 mm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=78：22、流速 4.0 mL/min) で精製したところ、88 分後に化合物 77 が、91 分後に化合物 76 が溶出した。それぞれを取り分け、更に ODS カラム (コスモシル 75C18-OPN、15×100 mm、最初に H<sub>2</sub>O を 50 mL 流し、次に 25% アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物 76 が 1.6 mg、化合物 77 が 1.8 mg 得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

#### 【0107】

##### 化合物 76 のデータ

##### <sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.53-7.40 (m, 9H, Fmoc, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5.38 (d, 1H, J=12.1 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5.31 (d, 1H, J=12.1 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5 Hz, , GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (m, 3H, GlcNAc2,5,5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=7.9 Hz, Gal6'-H-1), 4.33 (d, 1H, J=7.9 Hz, Gal6-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, Asn-βCH), 2.68 (dd, 1H, J=4.6 Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H-3eq), 2.52 (dd, 1H, J=8.7 Hz, 15.0 Hz, Asn-βCH), 2.07, 2.04, 2.03, 2.02, 1.89 (each s, each 3H, Ac), 1.84 (dd, 1H, J=12.7 Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H3ax); MS

(F a b) C a l c d f o r  $C_{99}H_{143}N_{17}NaO_{58}$  [M+H]  
2380.8, f o u n d 2380.0

## 【0108】

化合物77のデータ

$^1H$ -NMR (30℃)

$\delta$  7.91 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.53-7.41 (m, 9H, Fmoc,  $-CH_2-$ Ph), 5.37 (d, 1H,  $J=12.1$  Hz,  $-CH_2-$ Ph), 5.31 (d, 1H,  $J=12.1$  Hz,  $-CH_2-$ Ph), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.8$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.93 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (m, 3H, GlcNAc2,5,5'-H-1), 4.46 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Gal6-H-1), 4.33 (d, 1H,  $J=7.8$  Hz, Gal6'-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, Asn- $\beta$ CH), 2.68 (dd, 1H,  $J=4.8$  Hz, 13.0 Hz, NeuAc7-H-3eq), 2.52 (bdd, 1H,  $J=9.7$  Hz, 14.1 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.06, 2.05, 2.04, 2.02, 1.89 (each s, each 3H, Ac), 1.84 (dd, 1H,  $J=13.0$  Hz, 13.0 Hz, NeuAc7-H-3ax);  
MS (F a b) C a l c d f o r  $C_{99}H_{143}N_{17}NaO_{58}$  [M+H]  
+] 2380.8, f o u n d 2380.5

## 【0109】

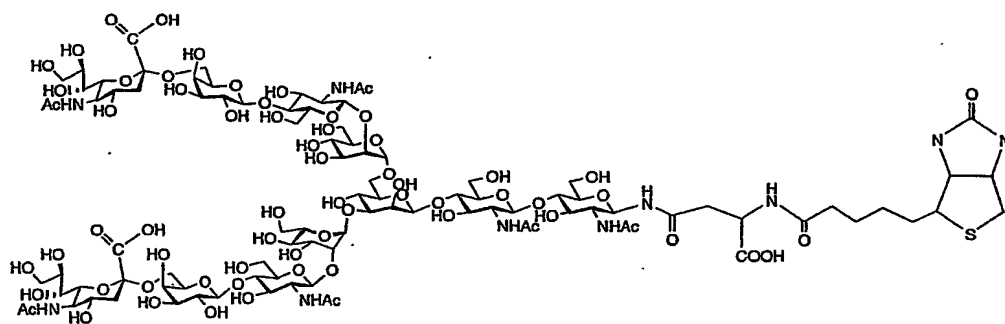
実施例1

参考例1で得られた化合物24 (6mg, 2.58mmol) を水 (300mL) 溶かし重炭酸ナトリウム (2.1mg, 24.9mmol) を加えた。ここに、D-(+) -ビオチニルスクシンイミド (4.2mg, 12.3mmol) を溶かしたジメチルホルムアミド (300mL) を加え、室温で20分反応させた。原料消失をTLC (イソプロパノール: 1M 酢酸アンモニウム水溶液=3:2

)で確認後、エバポレーターを用いて濃縮した。残渣をゲルろ過カラム (φ 20 mm×300 mm, Sephadex G-25, 水) で精製し、目的とする化合物 (6.2 mg, 94%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

【0110】

【化16】



【0111】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C,  $\text{HOD}=4.81$ )  
 δ 5.22 (s, 1H, Man 4-H1), 5.14 (d, 1H, GlcNAc 1-H1), 5.03 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.59 (dd, 1H), 4.86 (s, 1H, Man 3-H1), 4.74-4.66 (m, 3H, GlcNAc 2,5,5'-H1), 4.53 (d, 2H, Gal 6,6'-H1), 4.34 (s, 1H, Man 3-H2), 4.28 (bs, 1H, Man 4-H2), 4.19 (bs, 1H, Man 4'-H2), 3.09 (dd, 2H, NeuAc 7,7'-H3eq), 2.94-2.86 (m, 2H, biotin), 2.78-2.71 (m, 2H, biotin), 2.37 (t, 1H, biotin), 2.17, 2.16, 2.13, 2.11 (each s, Ac), 1.80 (dd, 2H, NeuAc 7,7'-H3ax), 1.80-1.67 (m, biotin), 1.52-1.47 (m, biotin), 1.32 (dd, biotin)

【0112】

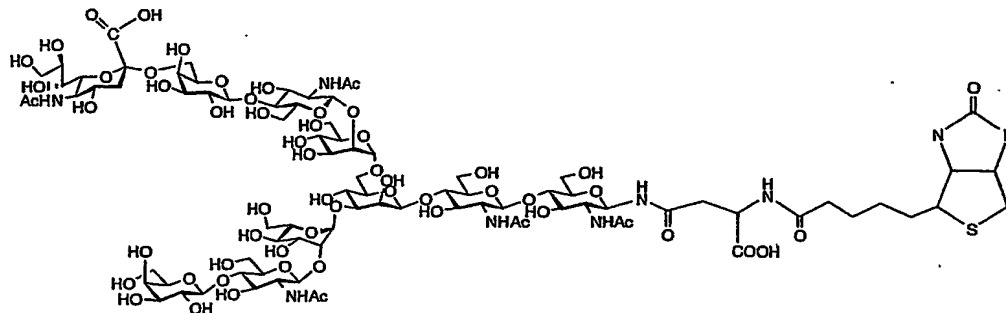
## 実施例 2

参考例 45 で得られた化合物 76 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン

化を行った。

【0113】

【化17】



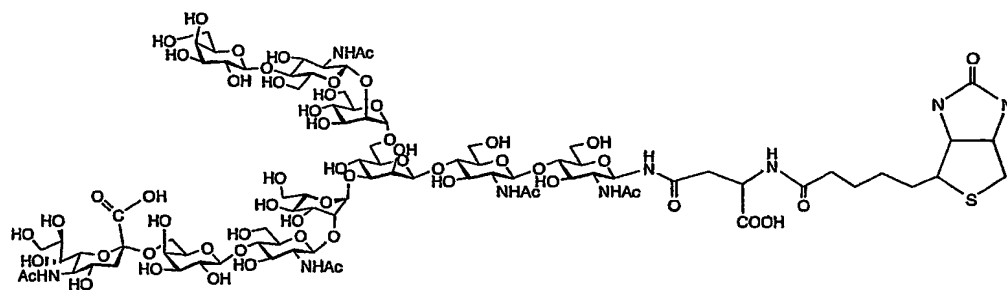
【0114】

実施例 3

参考例 45 で得られた化合物 77 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0115】

【化18】



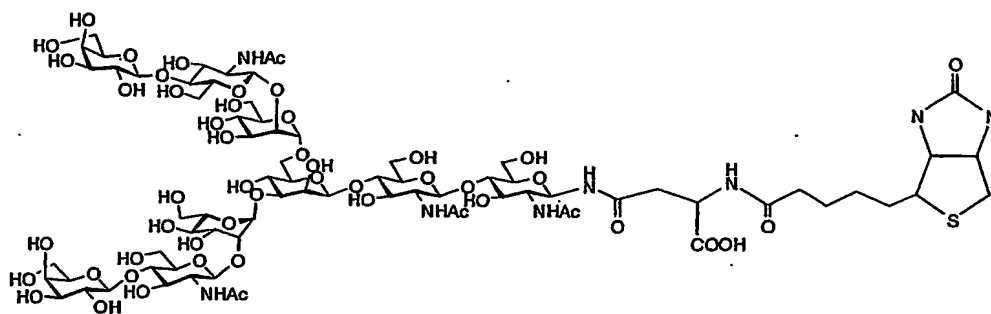
【0116】

実施例 4

参考例 7 で得られた化合物 33 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0117】

## 【化 19】



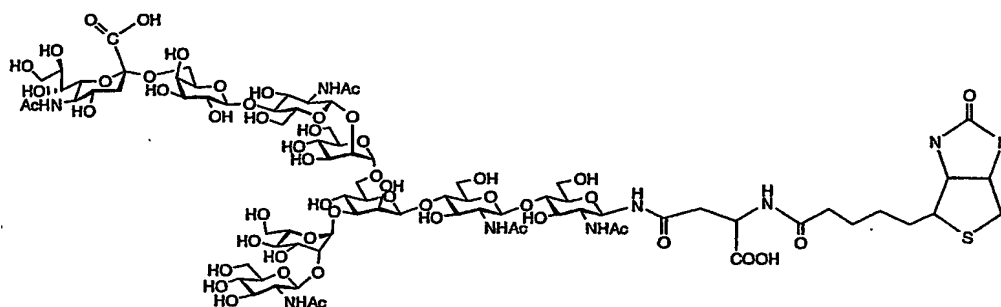
## 【0118】

## 実施例 5

参考例 24 で得られた化合物 26 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

## 【0119】

## 【化 20】



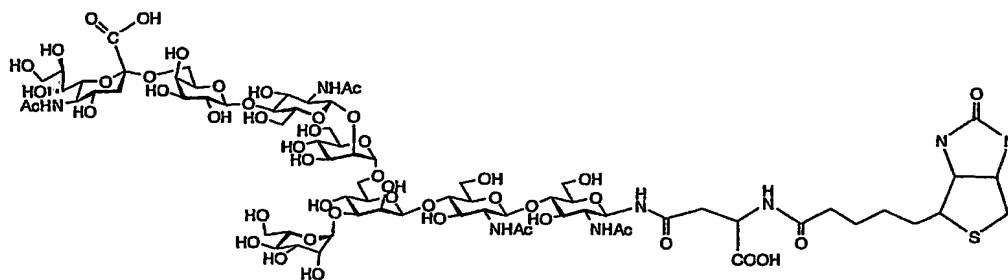
## 【0120】

## 実施例 6

参考例 25 で得られた化合物 27 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

## 【0121】

## 【化 2 1】



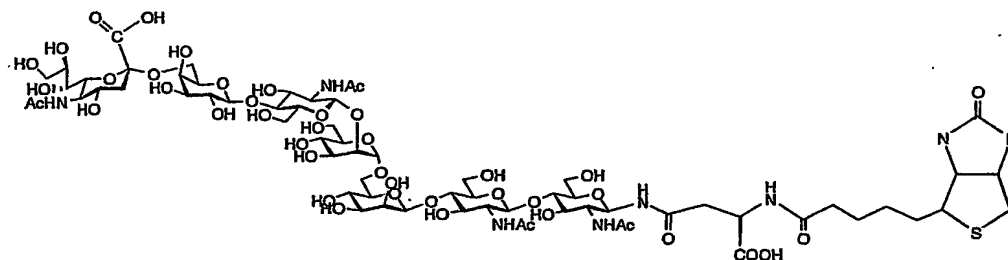
## 【0 1 2 2】

## 実施例 7

参考例 26 で得られた化合物 28 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

## 【0 1 2 3】

## 【化 2 2】



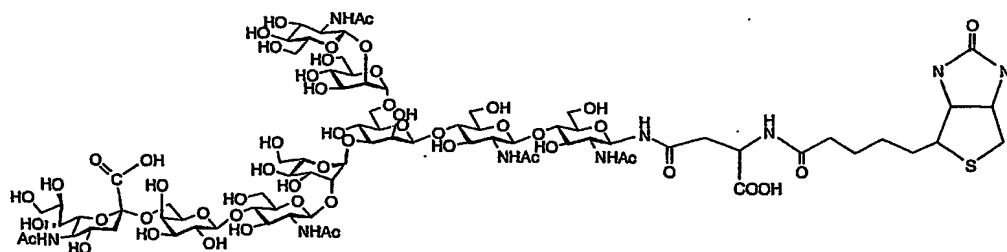
## 【0 1 2 4】

## 実施例 8

参考例 27 で得られた化合物 30 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

## 【0 1 2 5】

## 【化 2 3】



## 【0 1 2 6】

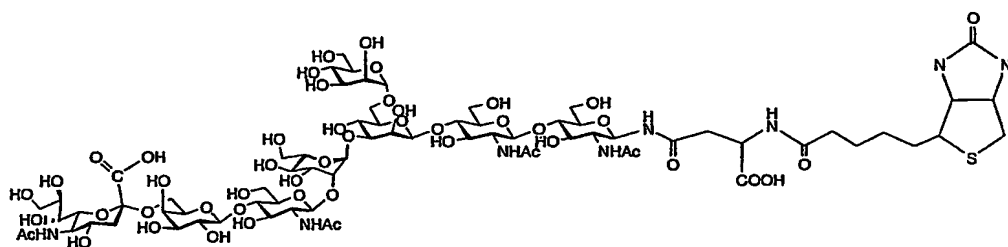


## 実施例 9

参考例 28 で得られた化合物 31 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0127】

【化 24】



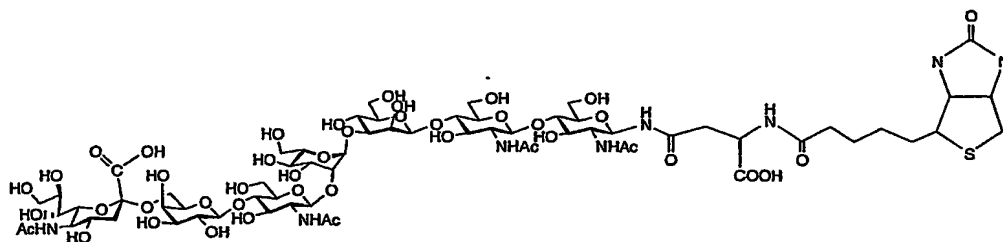
【0128】

## 実施例 10

参考例 29 で得られた化合物 32 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0129】

【化 25】



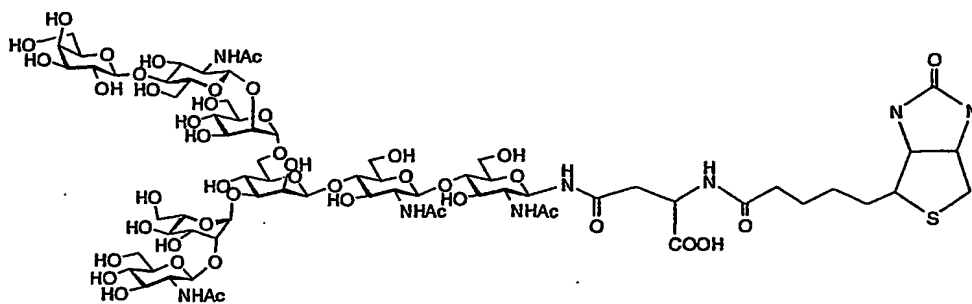
【0130】

## 実施例 11

参考例 30 で得られた化合物 37 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0131】

## 【化 26】



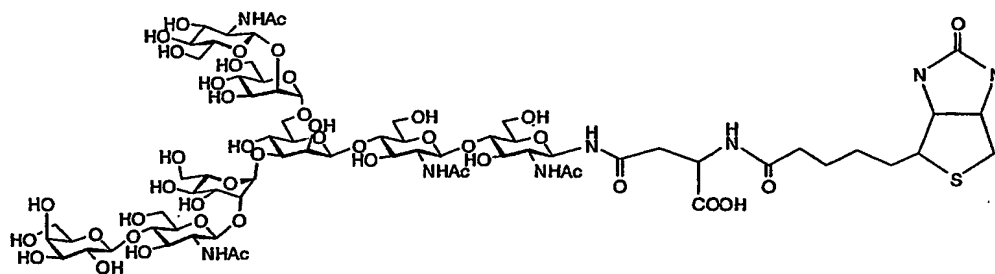
## 【0132】

## 実施例 12

参考例 31 で得られた化合物 42 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

## 【0133】

## 【化 27】



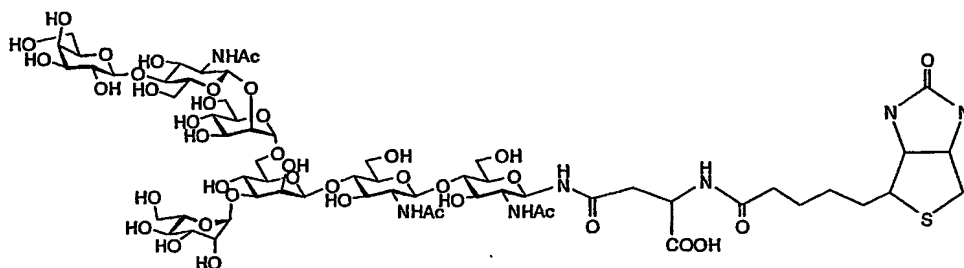
## 【0134】

## 実施例 13

参考例 32 で得られた化合物 38 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

## 【0135】

## 【化 28】



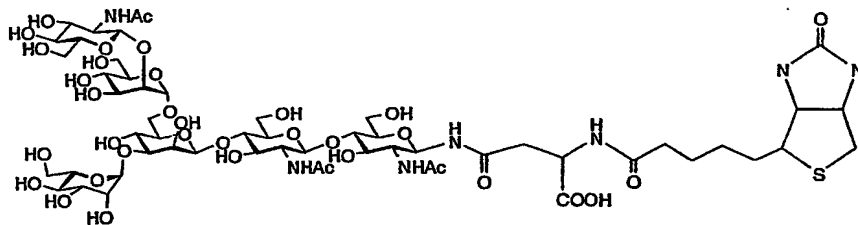
【0136】

## 実施例 14

参考例 33 で得られた化合物 72 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0137】

## 【化 29】



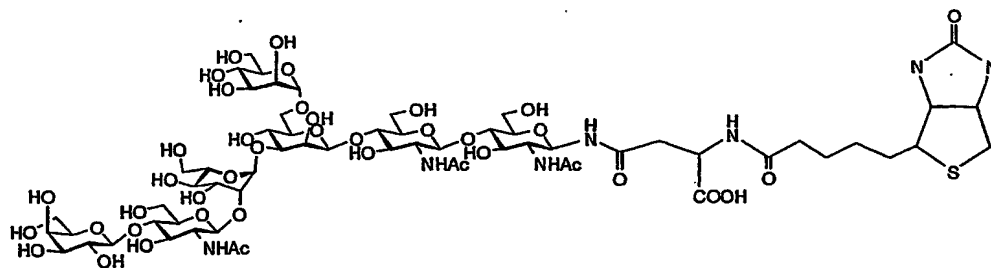
【0138】

## 実施例 15

参考例 34 で得られた化合物 43 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0139】

## 【化 30】



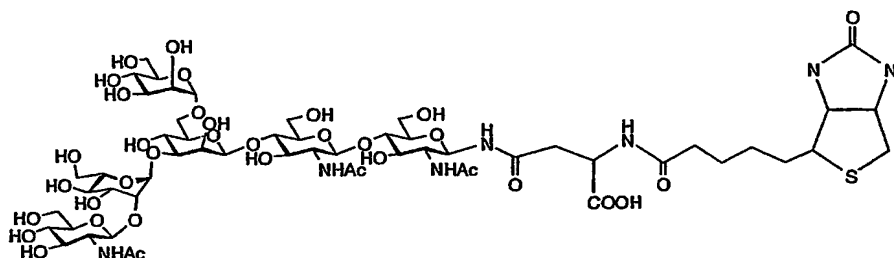
【0140】

## 実施例 16

参考例 35 で得られた化合物 73 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0141】

【化31】



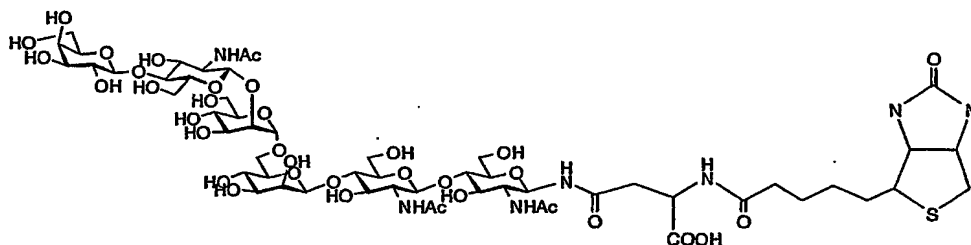
【0142】

実施例 17

参考例 36 で得られた化合物 39 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0143】

【化32】



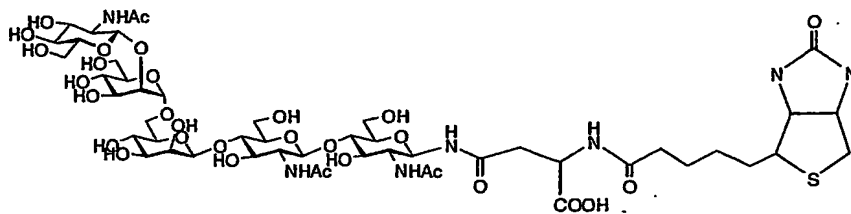
【0144】

実施例 18

参考例 37 で得られた化合物 40 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0145】

## 【化 3 3】



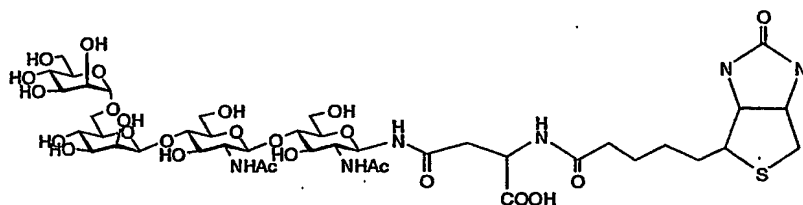
【0146】

## 実施例 19

参考例 38 で得られた化合物 41 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0147】

## 【化 3 4】



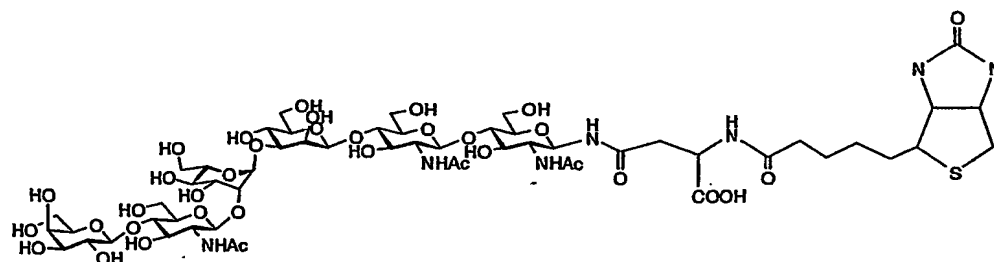
【0148】

## 実施例 20

参考例 39 で得られた化合物 44 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0149】

## 【化 3 5】



【0150】

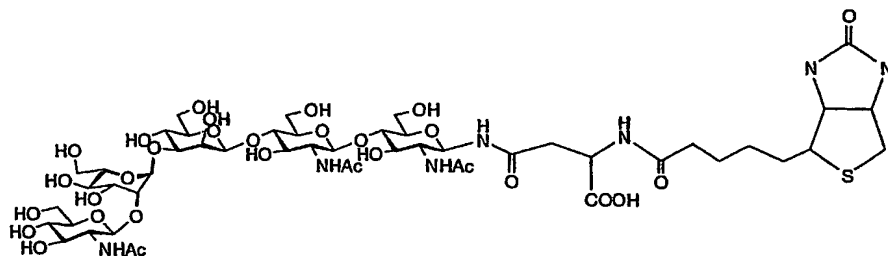
## 実施例 21

参考例 40 で得られた化合物 45 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン

化を行った。

【0151】

【化36】



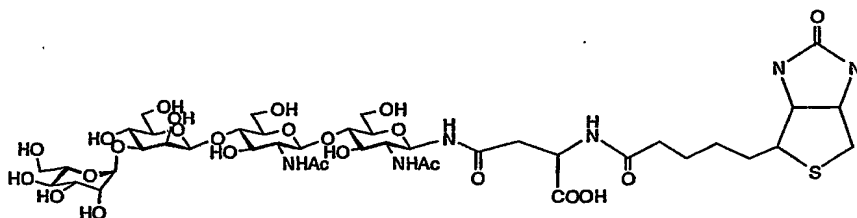
【0152】

## 実施例 22

参考例 41 で得られた化合物 46 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0153】

【化37】



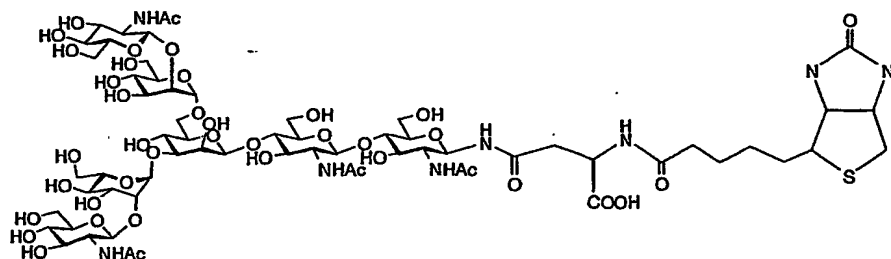
【0154】

## 実施例 23

参考例 42 で得られた化合物 34 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0155】

## 【化 38】



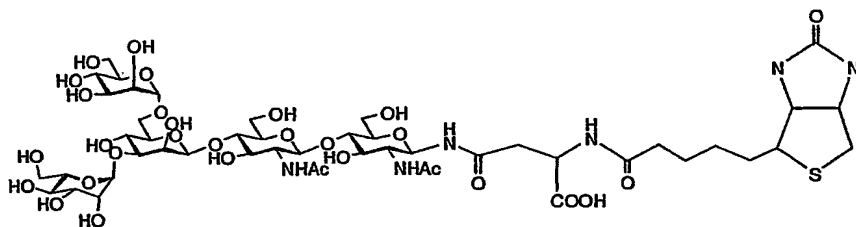
【0156】

## 実施例 24

参考例 43 で得られた化合物 35 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0157】

## 【化 39】



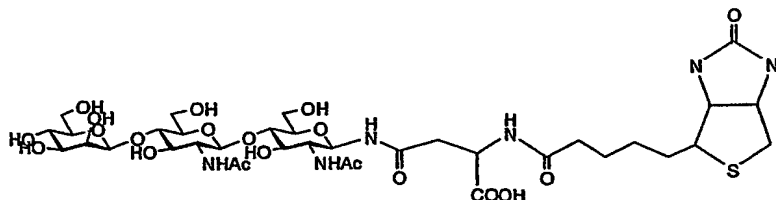
【0158】

## 実施例 25

参考例 44 で得られた化合物 36 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

【0159】

## 【化 40】



【0160】

## 【発明の効果】

本発明によれば、アスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化した糖鎖アスパラ

ギンが得られる。

更に本発明によれば、ビオチン・アビジンの結合特異性を利用し、ビオチン化した複数の糖鎖をアビジン化されたマイクロプレート上で反応させるだけで簡単に糖鎖マイクロチップを製造することができる。これにより、特定の糖鎖と結合能を有するタンパク質を解明することができる。

また、ある特定のタンパク質を分離精製する目的で、アビジン化したアフィニティーカラムに特定のビオチン化した糖鎖を結合し固定化し、そこに、ビオチン化した糖鎖と特異的結合能を有するタンパク質を含む混合物を通すことにより目的とするタンパク質のみを単離することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の実施例で用いられた糖鎖アスパラギンの化学式を示す。

【図 2】 本発明の実施例で用いられた糖鎖アスパラギンの化学式を示す。

【図 3】 本発明の実施例で用いられた糖鎖アスパラギンの化学式を示す。

【図 4】 本発明の参考例で用いられた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

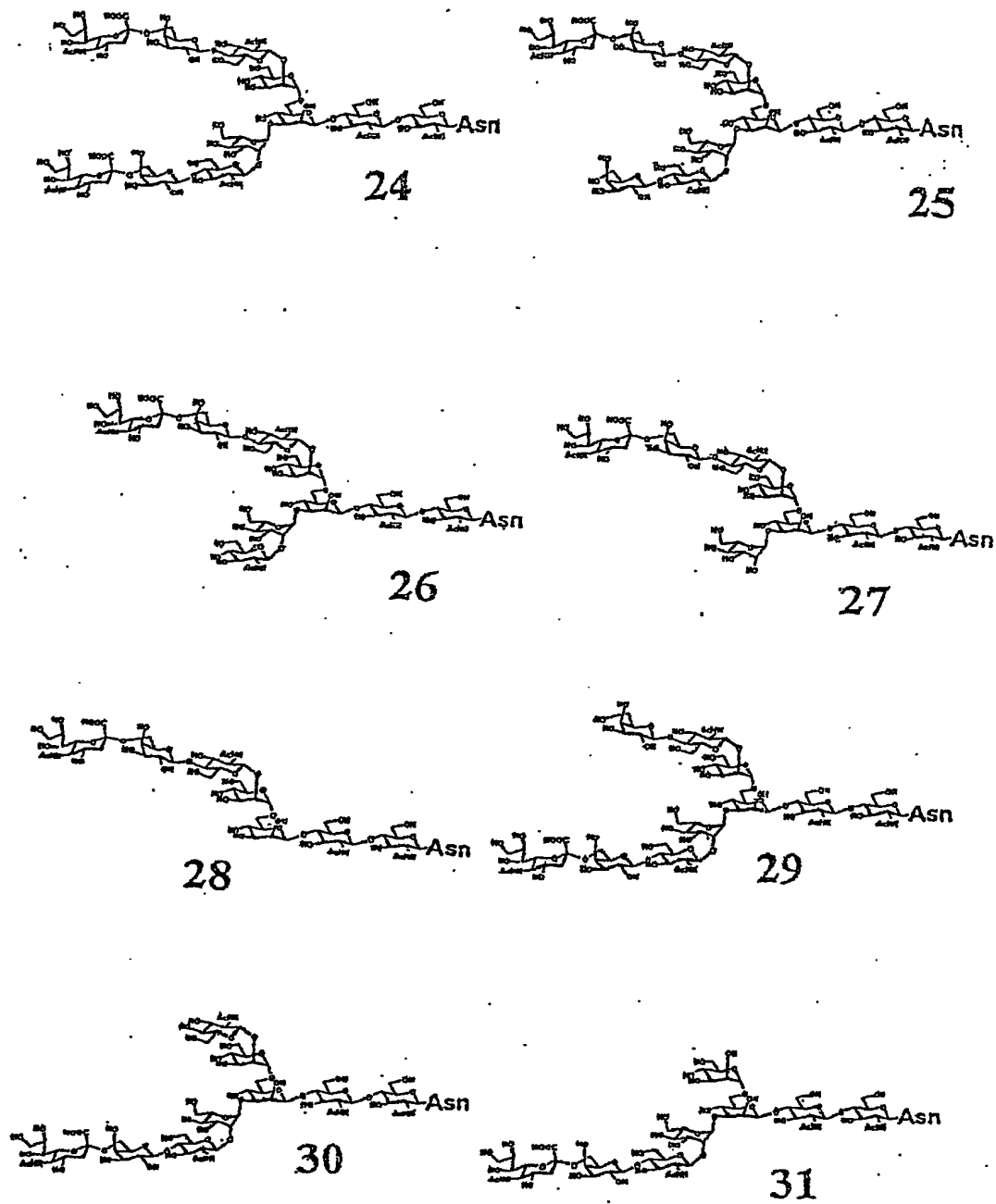
【図 5】 本発明の参考例で用いられた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

【図 6】 本発明の参考例で用いられた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

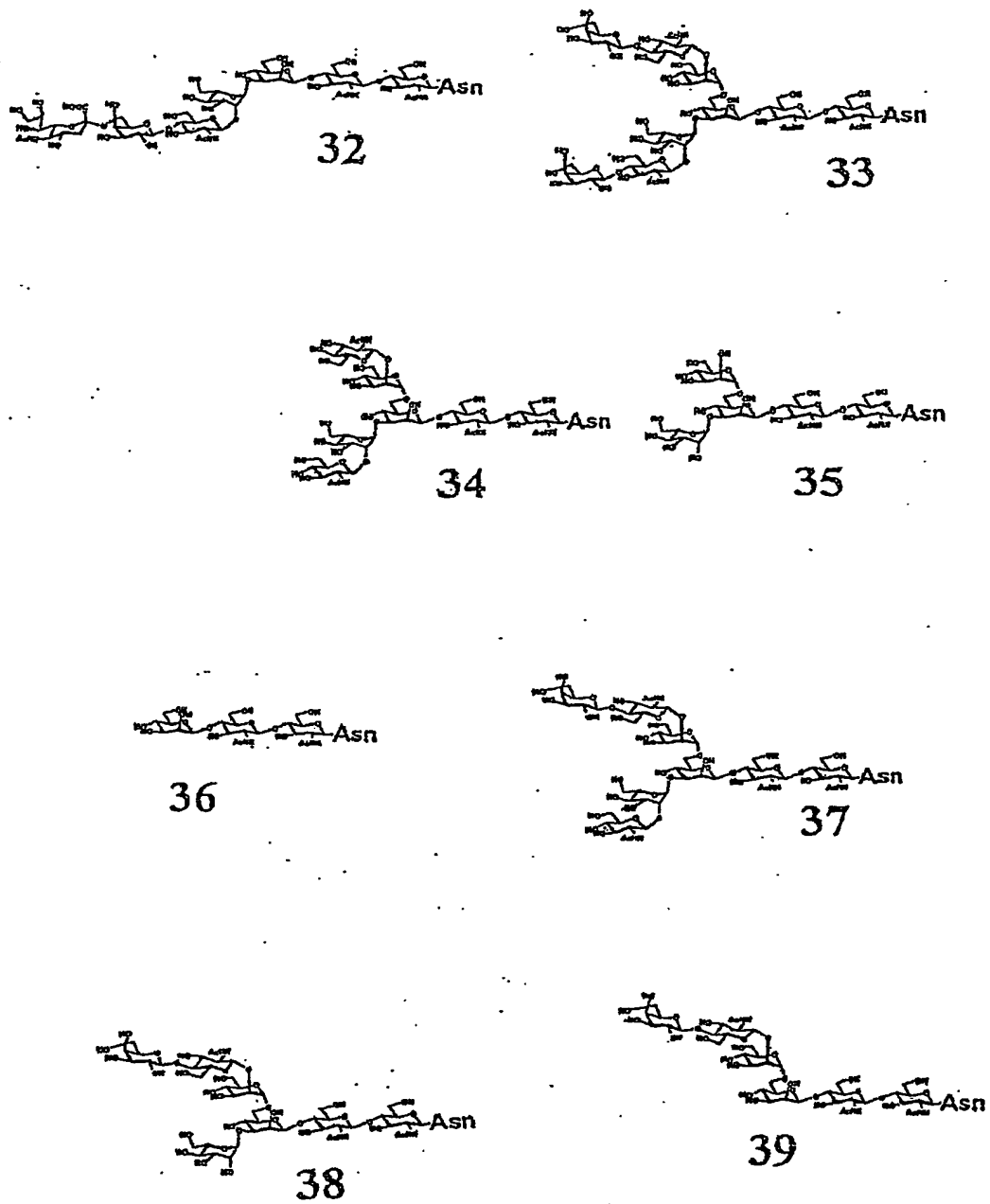


【書類名】 図面

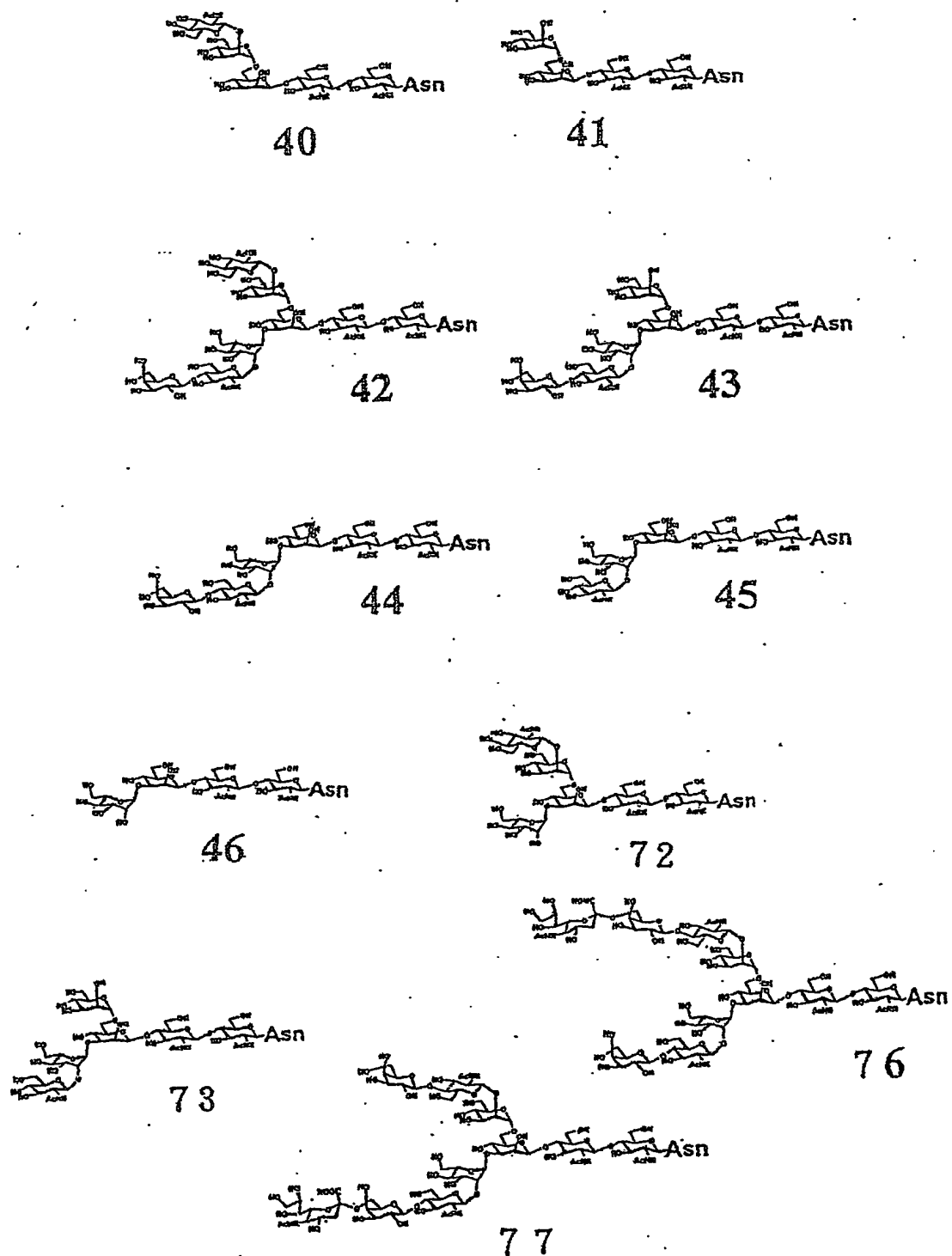
【図 1】



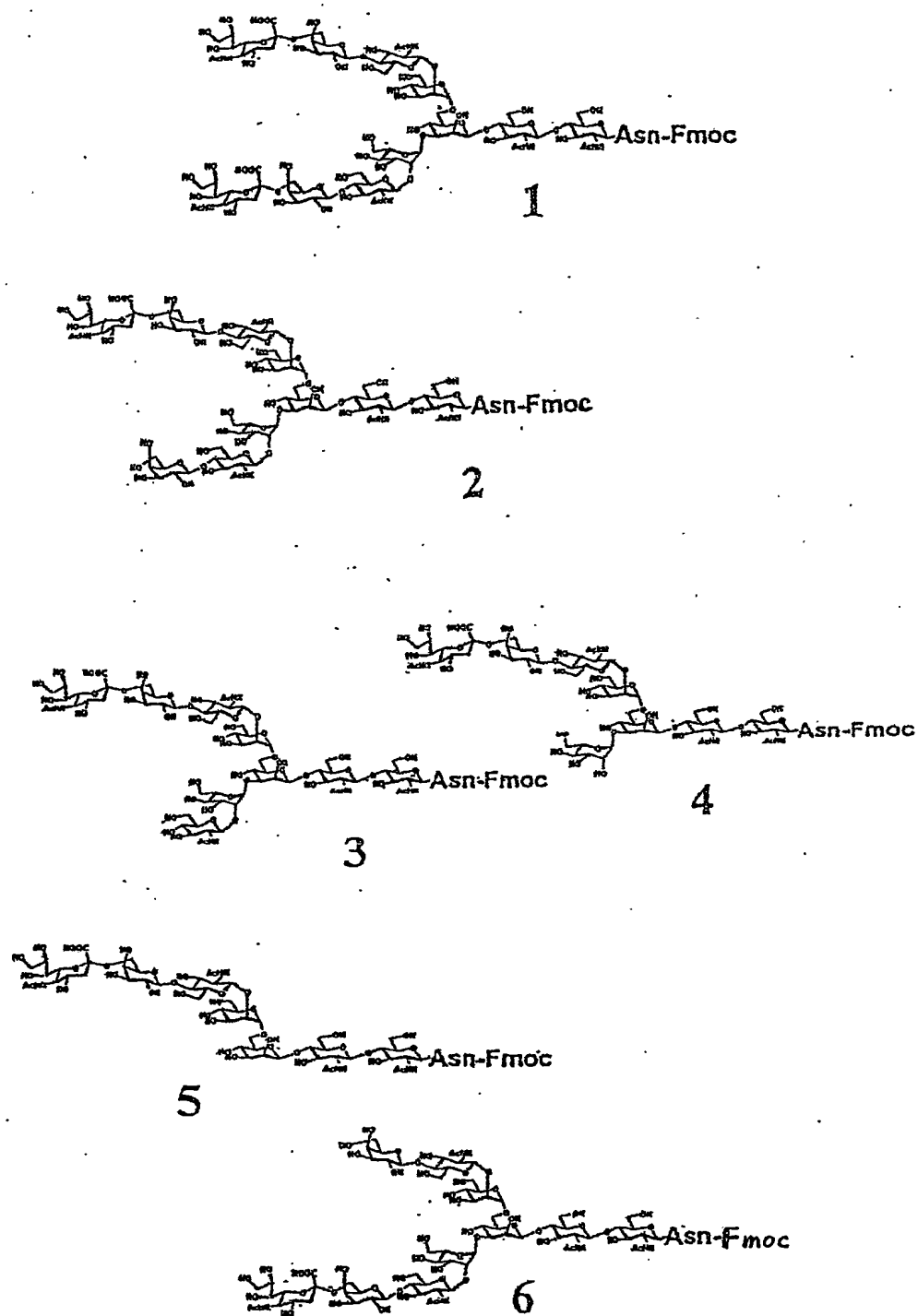
【図 2】



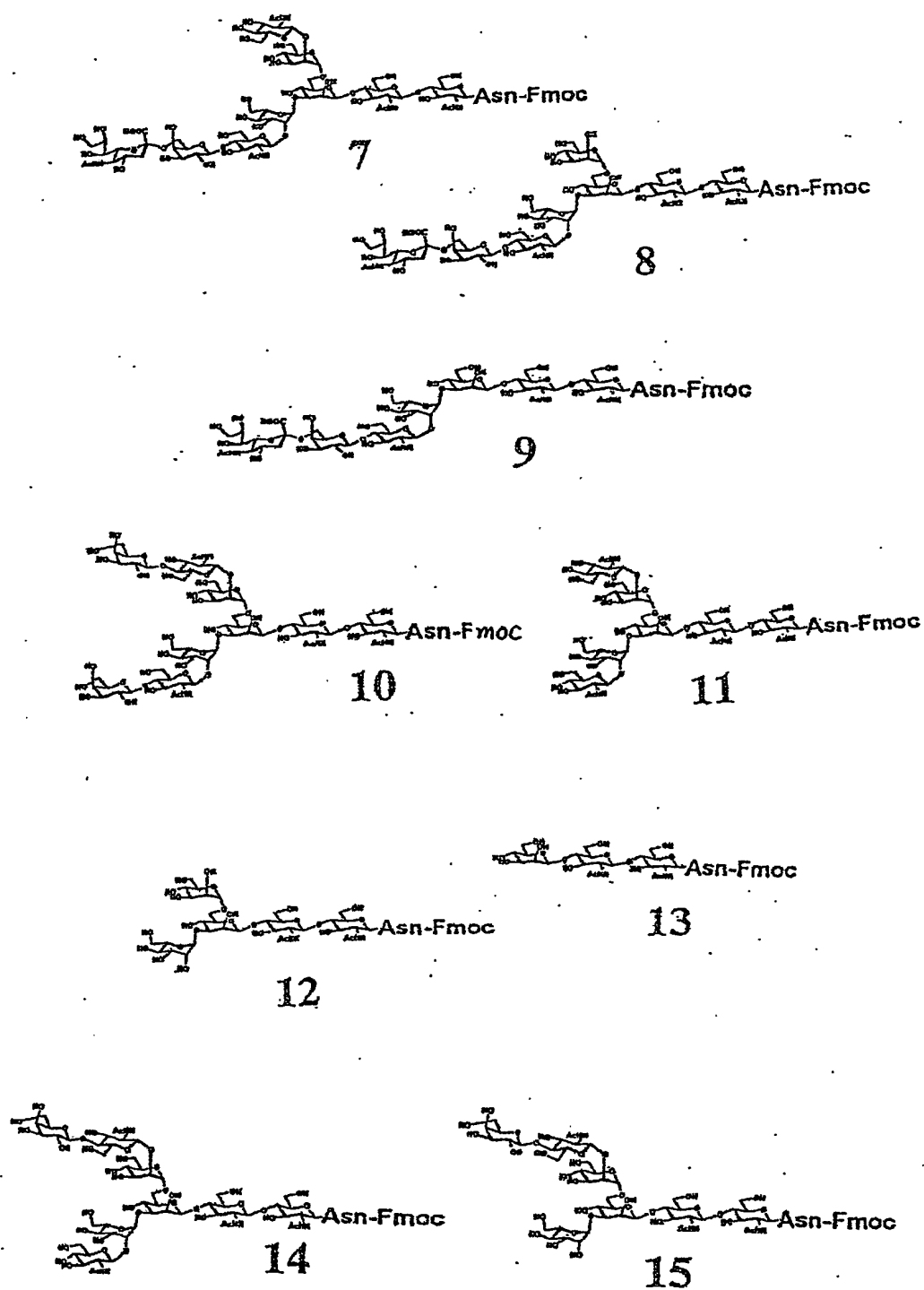
【図3】



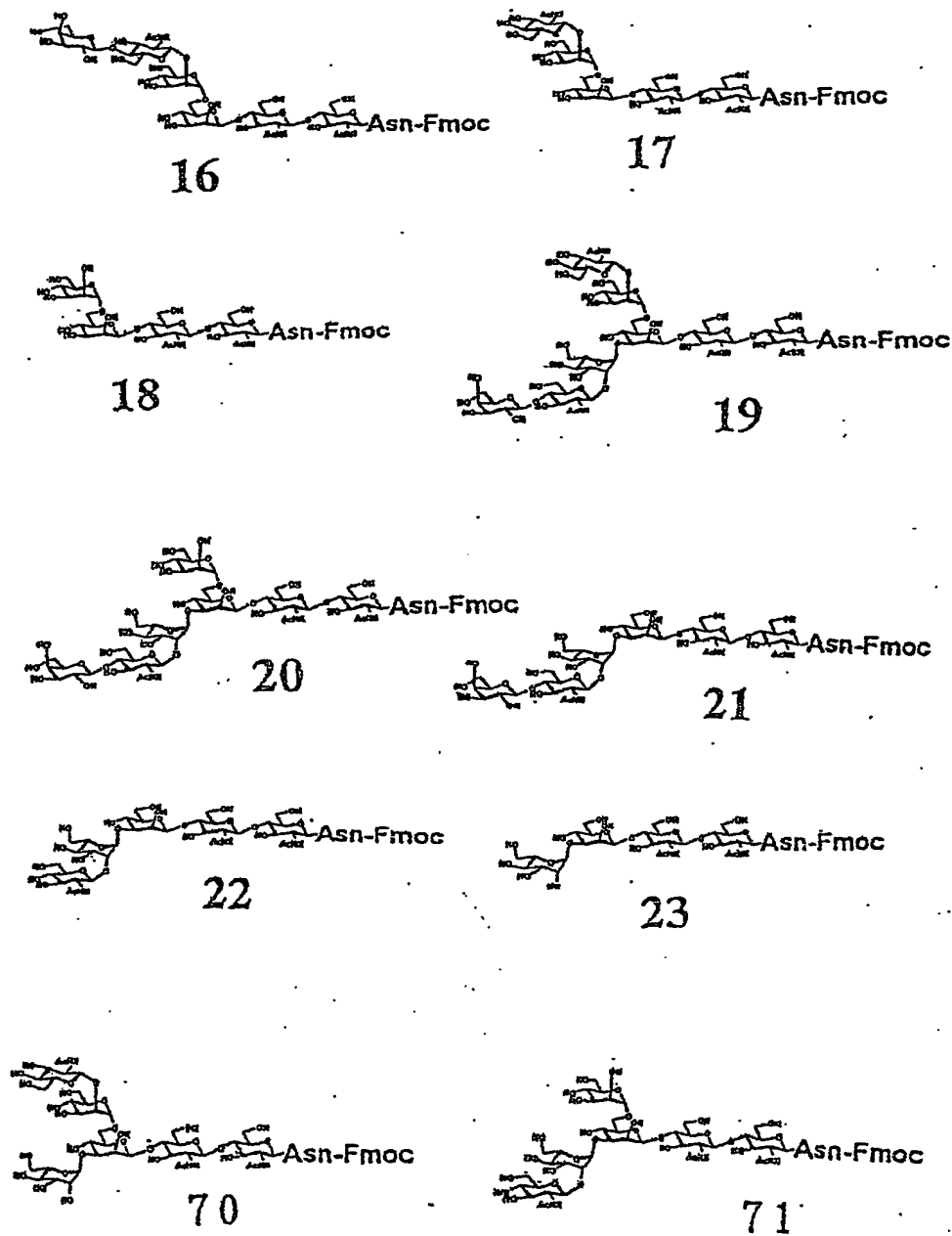
【図 4】



【図 5】



【図6】



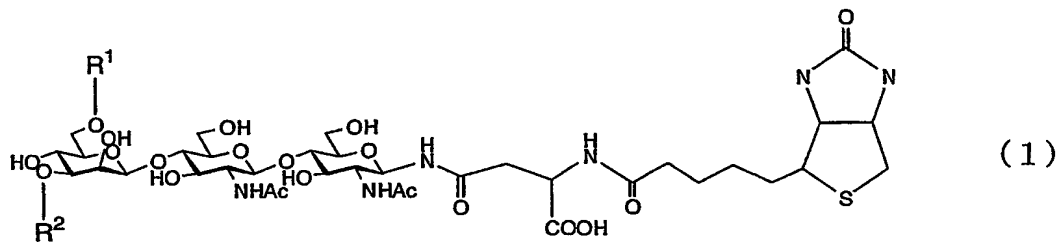
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化した糖鎖アスパラギン、その製造方法及びその用途を提供する。

【解決手段】 下記式で表されるビオチン化糖鎖アスパラギン。

【化 1】



〔式中、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は明細書の記載に同じ。〕

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-377819
受付番号	50201977874
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 1月 6日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年12月26日
-------	-------------

次頁無



特願 2002-377819

出願人履歴情報

識別番号

[502244258]

1. 変更年月日

2002年 7月 5日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県横浜市都筑区牛久保東2-4-2-205

氏 名

梶原 康宏

特願 2 0 0 2 - 3 7 7 8 1 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 2 0 6 0 3 0 6 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 0 月 1 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区大手通 3 丁目 2 番 2 7 号

氏 名

大塚化学株式会社